

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

Estudio de la función telomérica y de moléculas relacionadas con invasión
en tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Pascua García

Directora

Pilar Iniesta Serrano

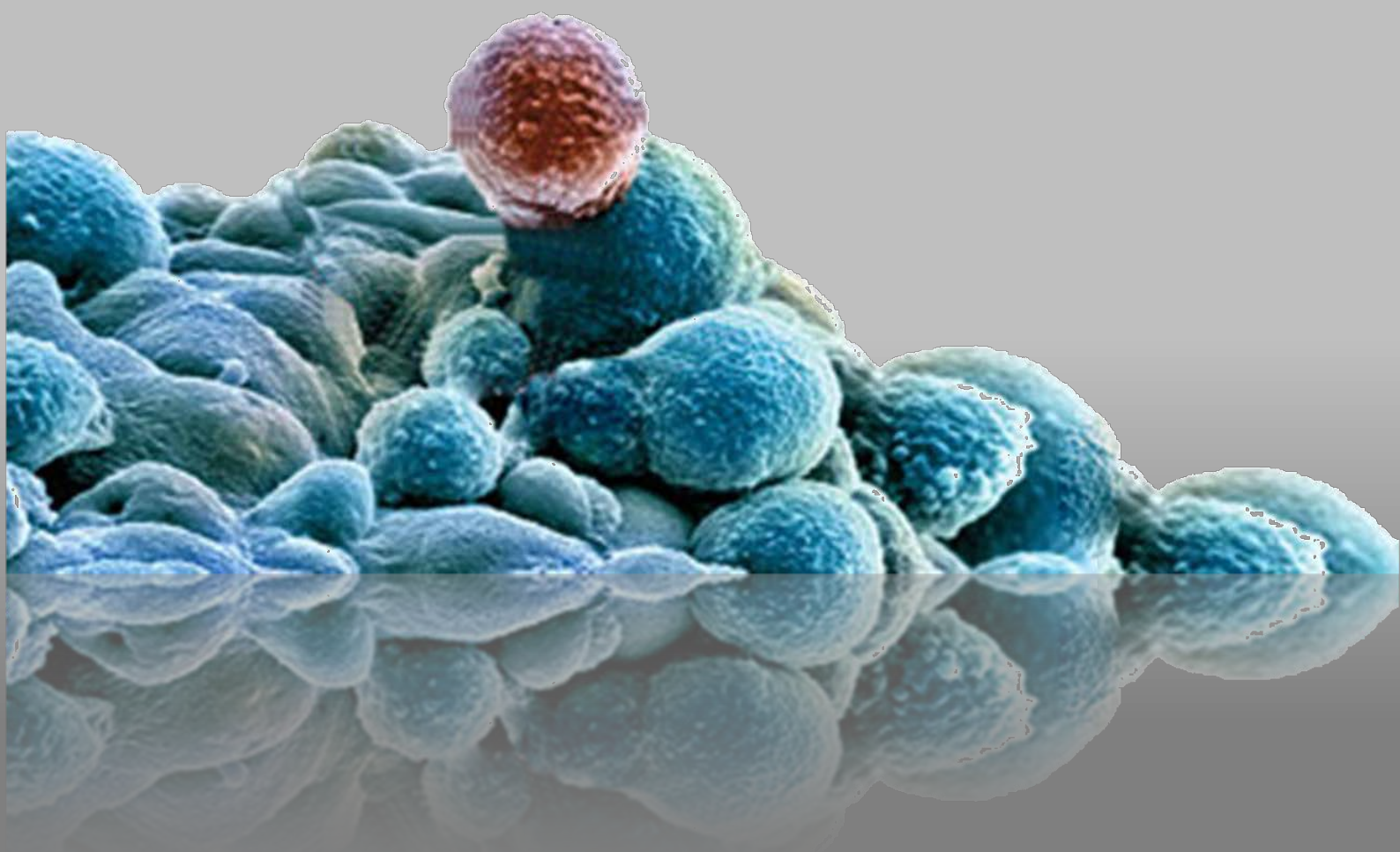
Madrid, 2015



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA Y DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON INVASIÓN EN TUMORES GÁSTRICOS CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES

TESIS DOCTORAL IRENE PASCUA GARCÍA



ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA Y DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON INVASIÓN EN TUMORES GÁSTRICOS CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES

Opta al grado de doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

Irene Pascua García



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Foto de portada:

Cancer stem cell. Adaptado de:
Medicine: Shooting down cancer.
www.economist.com.

Gracias a El Pangolín.

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Pilar Iniesta Serrano, y gracias a la financiación de los proyectos FIS PI080033 y de la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (1782/2008).



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

“Hallaré un camino, o lo abriré”

Anibal, general cartaginés. 247-183 a.c.

A todos los que lucharon en la batalla contra el cáncer, y perdieron.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN..... 1

1.1 CÁNCER GÁSTRICO 3

1.1.1 Principales factores de riesgo en cáncer gástrico. 5

1.1.1.1 Cáncer gástrico asociado a procesos infecciosos 5

A. *Helicobacter pylori* 5

B. Virus de Epstein-barr..... 6

1.1.1.2 La importancia de la dieta 7

A. Consumo de sal 7

B. Alimentación: El equilibrio entre el riesgo y la prevención 7

C. Consumo de alcohol 8

1.1.1.3 Hábito tabáquico 8

1.1.1.4 Cáncer gástrico hereditario 9

1.1.2 Clasificación histológica del cáncer gástrico 9

1.1.2.1 Clasificación de Lauren 10

A. Cáncer gástrico de tipo intestinal 10

B. Cáncer gástrico de tipo difuso 10

1.1.3 Localización anatómica del cáncer gástrico 11

1.1.4 Mecanismos moleculares de la carcinogénesis gástrica 11

1.1.4.1 Mecanismos de inestabilidad genómica 14

A. Inestabilidad cromosómica (CIN) 14

B. Inestabilidad en microsatélites (MSI) 15

C. Metilación de las islas CpG (CIMP) 16

1.2 TELÓMEROS Y TELOMERASA 19

1.2.1 ADN telomérico 19

1.2.2 Proteínas de unión al telómero: *shelterin* ... 20

1.2.2.1 Proteínas asociadas al complejo *shelterin*..... 22

1.2.3 La heterocromatina telomérica 23

1.2.3.1 Regulación epigenética de los telómeros 25

1.2.3.2 ARN telomérico (TERRA)..... 25

A. Localización de TERRA en los telómeros 26

B. Regulación de la transcripción de TERRA ... 27

C. Funciones de TERRA 28

1.2.4 Importancia de los telómeros durante la replicación 29

1.2.5 Mecanismos de mantenimiento telomérico 30

1.2.5.1 Reactivación de telomerasa 30

A. Mecanismo de acción de telomerasa en los telómeros 33

1.2.5.2 Mecanismos alternativos de mantenimiento telomérico 34

1.3 TELÓMEROS, TELOMERASA Y CÁNCER 37

1.4 PROTEASAS EN CÁNCER GÁSTRICO 41

1.4.1 Familias de proteasas implicadas en cáncer gástrico 42

1.4.1.1 Metaloproteasas 42

A. ADAMs 45

1.4.1.2 Cisteínproteasas 46

A. Catepsinas 46

B. Caspasas 47

C. Proteínas *hedgehog* 48

2. OBJETIVOS 51

2.1 OBJETIVOS..... 53

3. MATERIAL Y MÉTODOS..... 55

3.1 PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES 57

3.2 INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES..... 61

3.2.1 Aislamiento de ADN 61

A. Extracción de ADN 61

B. Valoración de la concentración y pureza del ADN extraído	62
C. Valoración de la integridad del ADN extraído	62
3.2.2 Estudio de inestabilidad en secuencias microsatélite	62
3.3 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA	65
3.3.1 Estudio de la longitud telomérica por análisis de los fragmentos de restricción terminal	65
3.3.2 Análisis de la longitud telomérica por PCR cuantitativa a tiempo real	66
3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA	71
3.4.1 Obtención de extractos protéicos	71
A. Extracción de proteínas	71
B. Valoración de las proteínas extraídas	71
3.4.2 Determinación de la actividad telomerasa	72
3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	75
3.5.1 Aislamiento de ARN	75
A. Extracción de ARN	75
B. Valoración de la concentración, pureza e integridad del ARN extraído	76
3.5.2 Síntesis de ADN complementario	76
3.5.3 Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real	78
3.5.3.1 Análisis de expresión génica mediante sondas <i>TaqMan</i> ®	78
3.5.3.2 Análisis de expresión génica mediante matrices personalizadas	80
3.6 CUANTIFICACIÓN DEL ARN TELOMÉRICO (TERRA).....	83
3.6.1 Análisis de TERRA por PCR cuantitativa a tiempo real mediante <i>SYBR Green</i> ®	83
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 87
4.1 FENOTIPO MUTADOR EN CÁNCER GÁSTRICO	89

4.1.1 Clasificación de la población de tumores gástricos en función del grado de inestabilidad en microsatélites	89
4.1.1.1 Inestabilidad en microsatélites y variables clínico-patológicas	91
4.1.1.2 Estudio pronóstico en relación con la inestabilidad en secuencias microsatélite de los tumores gástricos	93
4.2 FUNCIÓN TELOMÉRICA EN CÁNCER GÁSTRICO	97
4.2.1 Determinación de la longitud telomérica en tumores gástricos. Relación con las variables clínico-patológicas e impacto pronóstico	97
4.2.1.1 Determinación de la longitud de los fragmentos de restricción telomérica (TRF)	97
4.2.1.2 Validación de la longitud telomérica por PCR cuantitativa a tiempo real	100
4.2.1.3 Longitud telomérica y su relación con las variables clínico-patológicas	102
4.2.1.4 Estudio de pronóstico en cáncer gástrico en relación a la longitud telomérica	105
4.2.2 Determinación de la actividad telomerasa en tumores gástricos. Relación con variables clínico-patológicas e impacto pronóstico	109
4.2.2.1 Determinación de la actividad telomerasa	109
4.2.2.2 Relación entre la longitud telomérica y la actividad telomerasa	110
4.2.2.3 Actividad telomerasa y su relación con las variables clínico-patológicas	112
4.2.2.4 Estudio de pronóstico en cáncer gástrico en relación a la actividad telomerasa	114
4.3 FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TUMORES GÁSTRICOS CON INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES	117
4.3.1 Longitud telomérica en tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites	117
4.3.1.1 Longitud telomérica y su implicación en el pronóstico clínico de tumores gástricos con inestabilidad en microsatélites	119
4.3.2 Actividad telomerasa y su relación con la inestabilidad en microsatélites	120
4.3.2.1 Actividad telomerasa y su implicación en el pronóstico clínico de tumores gástricos con inestabilidad en microsatélites	122

4.4 FACTORES RELACIONADOS CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA 125

4.4.1 Estudio de expresión génica de los factores de unión a las repeticiones teloméricas, *TRF1* y *TRF2*..... 125

4.4.1.1 Expresión génica de *TRF1* y *TRF2* en tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites 132

4.4.2 Cuantificación de los niveles de TERRA 134

4.4.2.1 Cuantificación de los niveles de TERRA en tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites 137

4.5 DEGRADOMA TUMORAL EN CÁNCER GÁSTRICO 141

4.5.1 Análisis de expresión génica de proteasas implicadas en cáncer gástrico 141

4.5.2 Expresión génica de proteasas en tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites 145

4.6 DISCUSIÓN FINAL 146

5. CONCLUSIONES 146

5.1 CONCLUSIONES 146

6. BIBLIOGRAFÍA 146

6.1 BIBLIOGRAFÍA 146

7. SUMMARY 146

7.1 SUMMARY 146

8. ANEXOS 146

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA: ácido etilen-di-amino-tetra-acético.

Hinf I: *Haemophilus influenza R*, endonucleasa de restricción.

p/v: peso/volumen.

PAS: ácido peryódico de Schiff.

pb: pares de bases.

rpm: revoluciones por minuto.

Rsa I: *Rhodopseudomonas sphaeroides*, endonucleasa de restricción.

V: voltios.

VG: tinción de Van Giesson.

v/v: volumen/volumen.

Introducción

1

1.1

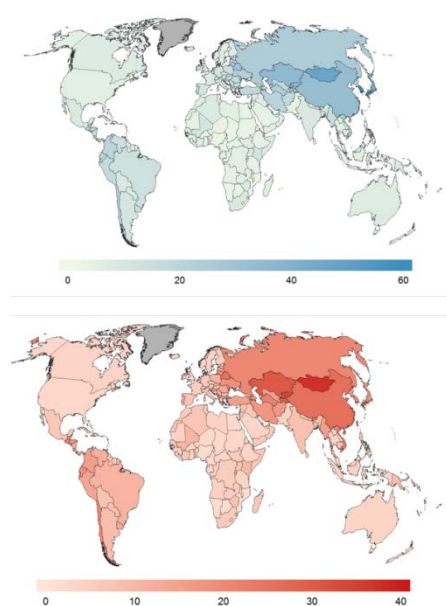
CÁNCER GÁSTRICO

El cáncer de estómago es el quinto tipo más común de cáncer a nivel mundial, por detrás del cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal y el cáncer de próstata. Sin embargo, ocupa el tercer puesto entre los tipos tumorales causantes de mayor número de muertes, con un 8.8% del total. En 2012, se estimaron un millón de nuevos casos diagnosticados de cáncer gástrico, lo que supuso un 6.8% del total de afectados por cáncer, de los cuales, aproximadamente un 70% ocurrieron en países en vías de desarrollo. La prevalencia del cáncer gástrico en España es menor, siendo el octavo tipo de cáncer más común en ambos sexos, y el sexto en mortalidad (Ferlay et al., 2014).

En la década de los cincuenta, el cáncer de estómago era considerado el tipo tumoral más común a nivel mundial; sin embargo, su incidencia ha disminuido a lo largo de los últimos años, probablemente debido a mejoras en las condiciones de conservación de los alimentos, y cambios en las pautas de consumo, pero también gracias a la erradicación de la infección por *Helicobacter pylori*, o a la disminución del hábito tabáquico (Jemal et al., 2011; Ferlay et al., 2014).

La incidencia del cáncer gástrico varía en función de la localización geográfica. Las áreas de mayor riesgo se encuentran en el este de Europa, algunas zonas de América del Sur, y en el este asiático, en países como China o Japón, donde se localizan el 50% de los casos a nivel mundial (Crew y Neugut, 2006) (**Figura 1.1**). Estas variaciones regionales son el reflejo de los distintos patrones de comportamiento a nivel de la dieta alimenticia que se dan en cada población, y de las diferencias geográficas que se observan en la distribución de la infección por *Helicobacter pylori* (Parkin, 2006). Los países que muestran una elevada prevalencia de este tipo de infección son coincidentes con los países de mayor incidencia de cáncer gástrico, al igual que su erradicación en países desarrollados coincide con una disminución de la incidencia de dicha patología.

Figura 1.1
Distribución geográfica de la incidencia (azul) y mortalidad (rojo) del cáncer gástrico a nivel mundial (Ferlay et al., 2014).



Esta disminución solo se observa en el caso de tumores gástricos localizados en el área distal del estómago (tumores no localizados en el cardias), pero no en el caso específico de tumores gástricos de localización proximal (tumores localizados en el cardias), cuya incidencia ha sufrido un incremento durante las últimas décadas, y con los que la infección por esta bacteria no está asociada (Eslick, 2006; Carr et al., 2013).

Del mismo modo, se observan diferencias geográficas entre los dos tipos histológicos considerados en cáncer gástrico, teniendo en cuenta la clasificación de Lauren (Lauren, 1965). El denominado cáncer gástrico de tipo intestinal es predominante en las áreas de riesgo como el este de Asia, el este de Europa, y América del Sur y Central; mientras que el carcinoma gástrico de tipo difuso tiene una distribución más homogénea (Muñoz et al., 1968). El índice de prevalencia del cáncer de estómago en los hombres es el doble que en las mujeres, llegando incluso a un ratio seis veces mayor en hombres que en mujeres, como en el caso del carcinoma gástrico proximal (Ferlay et al., 2014).

La mortalidad del cáncer de estómago también se ha visto disminuida en las últimas décadas en la mayoría de áreas a nivel mundial. Las zonas de mayor riesgo muestran niveles de mortalidad bajos gracias a la implantación de programas de detección precoz que se han puesto en marcha en países como Japón, al contrario de lo que sucede en zonas de Europa en las que, a pesar de mostrar una menor incidencia, la supervivencia a cinco años está en torno al 20%. Estas desigualdades también son atribuidas en parte al diferente pronóstico clínico que presentan los tumores gástricos del cardias, cuyo índice de supervivencia es menor que el caso de los tumores gástricos de localización distal, y que es más prevalente en estas zonas (Verdecchia et al., 2004; Jemal et al., 2011).

1.1.1 PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO EN CÁNCER GÁSTRICO.

1.1.1.1 CÁNCER GÁSTRICO ASOCIADO A PROCESOS INFECCIOSOS.

A. *Helicobacter pylori*.

La presencia en el estómago de una infección debida a la presencia de *Helicobacter pylori*¹ es considerado el mayor factor de riesgo en el desarrollo del cáncer gástrico. Esta bacteria fue clasificada como carcinógeno en 1994 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) (IARC, 1994). Desde entonces, son numerosos los estudios en los que ha sido establecida como causa principal en el desarrollo de la mayoría de tumores gástricos esporádicos, pero no como causa única de la carcinogénesis.

La gastritis producida por *H. pylori* se caracteriza por ser un proceso crónico, que se manifiesta en alternancia con episodios agudos de inflamación de la mucosa gástrica. Este daño progresivo produce una respuesta inmunológica activa y persistente que, en combinación con factores ambientales y variaciones genéticas del propio hospedador, conducen a la atrofia de la mucosa, progresión a metaplasia intestinal y displasia y, finalmente, al desarrollo de un carcinoma (Correa y Houghton, 2007; Sepulveda, 2013; He et al., 2014).

Aunque la inflamación es el principal factor conductor hacia el desarrollo de una neoplasia en el estómago, se producen también otras alteraciones específicas que con-

tribuyen a un marco de cambios moleculares propios de esta asociación (Figura 1.2). Recientemente, se han asociado factores de virulencia presentes en la propia bacteria, como *cagA* (citotoxin associated gene A), *vacA* (vacuolating citotoxin gene) y *dupA* (duodenal

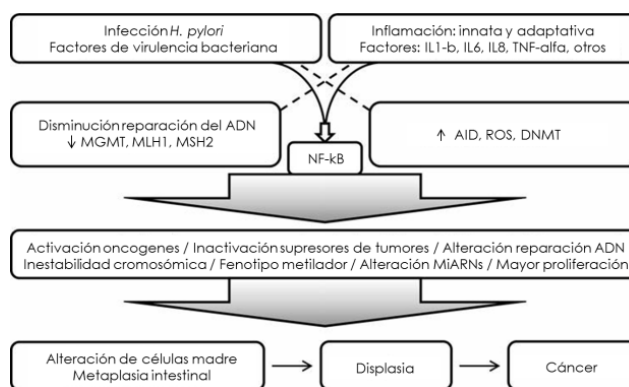


Figura 1.2
Factores implicados en el desarrollo del cáncer gástrico asociado a *H. pylori*. Adaptado de (Sepulveda, 2013).

¹ Bacteria gram (-) presente en el estómago humano con capacidad de colonizar la mucosa gástrica. Fue asociada con el desarrollo de úlceras pépticas y gastritis por primera vez en 1984 por Marshall y Warren, quienes fueron posteriormente galardonados con el premio Nobel de Medicina por sus trabajos sobre esta bacteria.

ulcer promoting gene A) con el riesgo a desarrollar cáncer gástrico en los individuos afectados por *H. pylori* (Shiota et al., 2013). La infección por *H. pylori* se asocia principalmente con tumores gástricos de tipo intestinal y localización distal, cuyo proceso de desarrollo también está relacionado con lesiones precancerosas que incluyen la gastritis crónica y la metaplasia intestinal. Sin embargo, la asociación entre la infección por *H. pylori* y los tumores gástricos de localización proximal no está del todo clara. Los tumores del cardias muestran dos orígenes etiológicos distintos, siendo asociados con *H. pylori* solamente aquellos de origen gástrico, pero no los de origen esofágico (Parsonnet et al., 1991; Hansen et al., 2007).

B. Virus de Epstein-barr.

El virus de *Epstein-barr* pertenece a la familia de los herpesvirus y posee cierta actividad oncogénica. Este virus ha sido detectado en enfermedades malignas de origen linfoides o epitelial, como el linfoma de Burkitt o el carcinoma nasofaríngeo. En 1990 fue detectado por primera vez en tumores gástricos, indicando la existencia de una asociación entre ambos (Burke et al., 1990).

Los tumores gástricos producidos por el virus de *Epstein-barr* son proliferaciones a partir de una única célula que ha sido infectada de forma persistente con el virus. Éste, permanece en estado de latencia expresando los genes virales *EBNA1* (*Epstein-barr nuclear antigen 1*), *EBER1* y *EBER2* (*Epstein-barr virus-encoded small RNAs 1 and 2*) para su mantenimiento, confiriendo a las células infectadas cierta ventaja en la supervivencia. La expresión de estos genes está sujeta a regulación epigenética, por lo que los tumores gástricos relacionados con el virus de *Epstein-barr* se asocian frecuentemente con el fenotipo metilador de las islas CpG (CIMP).

Los carcinomas gástricos asociados con la infección por el virus de *Epstein-barr* presentan una histología de tipo difuso y frecuente infiltración linfocitaria. Su incidencia se distribuye a lo largo de todo el mundo, pero los mayores índices se encuentran en países como EE.UU. o Alemania (Iizasa et al., 2012). Este tipo de tumores se corresponde con el 10% del total de los carcinomas gástricos diagnosticados.

1.1.1.2 LA IMPORTANCIA DE LA DIETA.

Como se ha comentado anteriormente, una de las razones de la existencia de una variación de tipo geográfico en la incidencia del cáncer gástrico se debe a la asociación entre los hábitos alimenticios de las diferentes partes del mundo y el riesgo de padecer cáncer de estómago. Los cambios en los métodos de conservación de alimentos, o el aumento del consumo de productos frescos, han sido asociados con la disminución de la incidencia del cáncer gástrico que se ha producido en los últimos años.

A. Consumo de sal.

La primera evidencia sobre la sal como factor de riesgo del cáncer de estómago data de 1959. Estudios posteriores han confirmado que un consumo elevado de sal aumenta el riesgo de padecer cáncer gástrico, pero el mecanismo por el cual la sal contribuye al desarrollo del cáncer permanece desconocido. Los métodos de conservación de alimentos basados en la sal, hoy en día han sido reemplazados por la refrigeración, contribuyendo de esta forma a la reducción de la incidencia del cáncer de estómago; sin embargo, este tipo de prácticas aún son muy comunes en algunos países en vías de desarrollo (D'Elia et al., 2012).

B. Alimentación: El equilibrio entre el riesgo y la prevención.

Algunos de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del cáncer gástrico están relacionados con la alimentación. El consumo de alimentos como la carne roja o la comida picante, y el hábito de cocinar alimentos asados, a la parrilla o ahumados, son perjudiciales debido a que contienen compuestos potencialmente carcinogénicos, como las nitrosaminas o los benzopirenos (Jakszyn et al., 2012). Por otro lado, una elevada ingesta de alimentos como el pescado, las verduras frescas o la fruta ayudan a reducir este riesgo (Serafini et al., 2002). Ciertos micronutrientes y minerales como el selenio, el zinc, la vitamina E o los carotenoides, también tienen un cierto papel protector frente al cáncer de estómago. Por ejemplo, se ha visto que la vitamina C reduce la formación de compuestos nitrosos y frena el riesgo de progresión de lesiones preneoplásicas hacia una enfermedad invasiva (Jenab et al., 2006; Duell et al., 2013).

La guía de nutrición y actividad física para la prevención del cáncer elaborada por la *American Cancer Society* (ACS) en 2012 (Kushi et al., 2012), recomienda el consumo de frutas y verduras, la realización de actividad física de forma diaria, y la disminución del consumo de carne procesada, sal y alimentos en conserva como pautas a seguir para la prevención del cáncer gástrico.

C. Consumo de alcohol.

Los metabolitos generados por el etanol mediante la vía de la alcohol deshidrogenasa (ADH), y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), tienen efectos tóxicos directos sobre la barrera de la mucosa gástrica. En ambos casos, se produce una respuesta inflamatoria crónica y un aumento de la absorción de compuestos nitrogenados; sin embargo, la relación del consumo de alcohol con el desarrollo del cáncer gástrico no parece ser tan evidente. Recientes estudios epidemiológicos no consideran el consumo de alcohol como un factor de riesgo independiente en el desarrollo del cáncer gástrico, pero sí en el caso de un consumo elevado, o asociado a otros hábitos como el consumo de tabaco (Tramacere et al., 2012).

1.1.1.3 HÁBITO TABÁQUICO.

El tabaco es un factor de riesgo muy importante en el desarrollo de varios tipos de tumores. En el caso del cáncer de estómago, el consumo de tabaco se ha descrito como un factor de riesgo de tipo dosis-dependiente, cuya influencia se ve aumentada en combinación con otros factores, como el consumo de alcohol o la intensidad con la que se fuma (Sjödahl et al., 2007). Sin embargo, los fumadores pasivos no muestran mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico que la población normal (Duan et al., 2009). Aproximadamente, el 18% de los tumores gástricos pueden ser atribuidos al consumo de tabaco, y su influencia es mayor en el caso de tumores gástricos con una localización próxima al esófago (Kneller et al., 1992; Ladeiras-Lopes et al., 2008).

1.1.1.4 CÁNCER GÁSTRICO HEREDITARIO.

Aproximadamente, el 10 - 15% de los tumores gástricos diagnosticados poseen un componente familiar hereditario. La presencia de síndromes hereditarios que confieren una predisposición al cáncer, como la poliposis adenomatosa familiar (FAP), el cáncer de colon hereditario no poliposo (HNPCC), o el síndrome de Peutz-Jeghers, aumentan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. El cáncer gástrico difuso hereditario (HDGC) es un tipo de tumor causado por mutaciones en la línea germinal de *CDH1* (*cadherin-1*), el gen codificante para la proteína de adhesión E-cadherina. Los individuos portadores de esta mutación tienen un 70% más de riesgo de desarrollar este tipo de cáncer que los individuos que no la presentan (Blair et al., 2006). Ocasionalmente, también se ha observado el desarrollo de cáncer gástrico en familias con mutaciones en la línea germinal de genes como *TP53* (*tumor protein 53*) (conocido como síndrome de Li-Fraumeni), o *BRCA2* (*breast cancer type 2*) (Barber et al., 2006; Yaghoobi et al., 2010).

1.1.2 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER GÁSTRICO.

A lo largo de los años se han desarrollado varios sistemas de clasificación para los carcinomas gástricos. Teniendo en cuenta las características macroscópicas del tumor, la más utilizada es la clasificación de Borrmann, que subdivide los carcinomas gástricos en cuatro tipos diferentes: tipo I (poliposo), tipo II (ulcerado), tipo III (ulcerado-infiltrante) y tipo IV (infiltrado difuso) (Borrmann, 1927).

Por otro lado, teniendo en cuenta las características microscópicas de los tumores, existen muchos sistemas diferentes de clasificación. Algunos de ellos son los desarrollados por Ming (Ming, 1977), Nakamura (Nakamura et al., 1968), Mulligan (Mulligan, 1972), o la clasificación establecida por la Asociación Japonesa de Cáncer Gástrico (JGCA, 2011). En cambio, las más usadas en este tipo tumoral son: la clasificación de Lauren, que subdivide los adenocarcinomas gástricos en dos patrones histológicos, difuso e intestinal (Lauren, 1965); y el sistema descrito por la OMS (WHO, 1999), que divide los carcinomas gástricos en 5 subtipos histológicos (adenocarcinoma, papilar, tubular, mucinoso y células en forma de anillo). Aproximadamente, el 95% de las neoplasias gástricas malignas de origen esporádico se consideran adenocarcinomas, por lo que el sistema de clasificación de Lauren es el más utilizado (Grabsch y Tan, 2013).

1.1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAUREN.

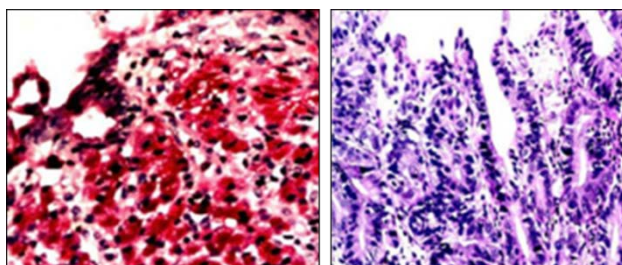
Según esta clasificación, los adenocarcinomas gástricos se subdividen en dos tipos histológicos principales: el tipo difuso y el tipo intestinal. Ambos subtipos poseen características diferentes, tanto morfológicas como clínico-patológicas (**Figura 1.3**). Aproximadamente, un 17% de los tumores gástricos no pueden ser clasificados por este sistema y se consideran adenocarcinomas indeterminados, no clasificables, o de tipo mixto, ya que poseen características de ambos tipos histológicos (Lauren, 1965; Werner et al., 2001; Vauhkonen et al., 2006).

A. Cáncer gástrico de tipo intestinal.

El carcinoma gástrico de tipo intestinal o bien diferenciado es el tipo histológico más común y se corresponde con el 50% de los casos. Generalmente se localizan en la zona distal del estómago, más próxima al intestino, de cuyas células adquieren cierta morfología, ya que las células del epitelio gástrico se desvían de sus vías normales de diferenciación hacia un fenotipo más intestinal. Este tipo de tumores presentan estructuras glandulares bien definidas, buena cohesión célula a célula, y exhiben bordes bien definidos. Su

crecimiento es de tipo superficial, muestran preferencia por la invasión hacia los vasos sanguíneos, y desarrollan metástasis hacia hígado o pulmones.

Figura 1.3
Microscopía óptica de dos tumores gástricos de tipo difuso e intestinal previa tinción con PAS y VG (400x). (Vauhkonen et al., 2006).



B. Cáncer gástrico de tipo difuso.

Los carcinomas gástricos de tipo difuso son tumores pobremente diferenciados. Microscópicamente, el tumor es una masa de aspecto mucoso, compuesta por células en forma de anillo, o bien por pequeñas agrupaciones de células sin apenas formación glandular. Son tumores cuyos bordes presentan un patrón de crecimiento infiltrativo y difuso, y se expanden mayoritariamente hacia la pleura o el peritoneo por vía linfática. Representan el 33% de los tumores gástricos, y se pueden localizar en cualquier parte del estómago, pero especialmente en el cardias.

1.1.3 LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL CÁNCER GÁSTRICO.

De acuerdo con la localización que presente el tumor, los carcinomas de estómago pueden subdividirse en tumores proximales, localizados en la zona superior del estómago, denominada cardias; o bien tumores distales, que son aquellos que se encuentran localizados en cualquier otra zona del estómago. Ambos subtipos muestran características etiológicas y epidemiológicas diferentes.

Hasta hace poco tiempo, los tumores del cardias representaban una pequeña proporción del global de los tumores gástricos; sin embargo, esta tendencia está cambiando. Su incidencia, en los últimos años, ha aumentado hasta suponer un 50% de los tumores gástricos diagnosticados en países desarrollados, al igual que ha ocurrido con la incidencia de otros tumores localizados en zonas similares, como los tumores de la unión gastroesofágica (OGJ), o de la zona distal del esófago (McColl, 2006).

Hay autores que consideran a los carcinomas del cardias como un subtipo particular de cáncer gástrico debido a las características que presentan, como la transformación hacia un tipo histológico indiferenciado en paralelo a la progresión tumoral, una penetración de la mucosa gástrica más profunda, metástasis a vasos linfáticos principalmente, y peor pronóstico clínico. Todas estas características son indicadoras de un fenotipo tumoral más agresivo que en el caso de los tumores distales (Tajima et al., 2007). Así mismo, también se ha visto que las modificaciones genéticas que se observan en este tipo de tumores son más parecidas a las observadas en tumores esofágicos, que a las observadas en los tumores gástricos de localización distal (El-Rifai et al., 2001).

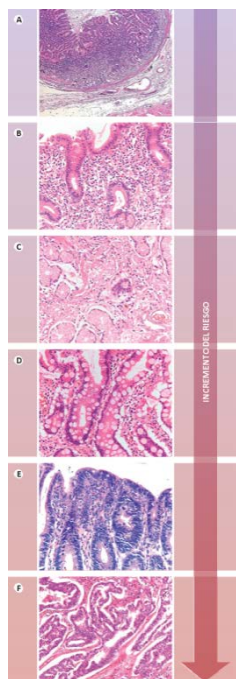
1.1.4 MECANISMOS MOLECULARES DE LA CARCINOGENESIS GÁSTRICA.

El cáncer de estómago es considerado una enfermedad multifactorial, ya que es el resultado de la combinación de una serie de factores ambientales, hereditarios, y alteraciones genéticas específicas. Las alteraciones, tanto genéticas como epigenéticas, de multitud de oncogenes, genes supresores de tumores, reguladores del ciclo celular, moléculas de adhesión y genes de reparación del ADN, están implicadas en el complejo proceso de la carcinogénesis gástrica.

La combinación particular de todas ellas resulta en la distinción de dos rutas genéticas distintas implicadas en el desarrollo de los tumores gástricos de tipo difuso e intestinal.

Figura 1.4

Secuencia de lesiones gástricas precancerosas de un carcinoma gástrico de tipo intestinal. (A) Mucosa normal, (B) Gastritis crónica, (C) Atrofia, (D) Metaplasia intestinal, (E) Displasia, (F) Carcinoma de tipo intestinal. Adaptado de (Hartgrink et al., 2009).



Los cambios secuenciales que se producen en la mucosa gástrica como antesala al desarrollo de un cáncer invasivo, se conocen como “cascada pre-cancerosa”, y fueron descritos por primera vez por Correa en 1975 (Correa et al., 1975). Este modelo de carcinogénesis describía el progreso de la mucosa gástrica hacia un carcinoma diferenciado de tipo intestinal, a través de una serie de lesiones precursoras. A partir de una gastritis crónica, se produce la atrofia del epitelio gástrico, el desarrollo de metaplasia intestinal y una posterior displasia (Figura 1.4) (Hartgrink et al., 2009).

Más recientemente, Tahara (Tahara, 2004) describió un modelo de carcinogénesis gástrica que resume la secuencia de eventos moleculares que se suceden durante el desarrollo de los tumores gástricos de tipo difuso e intestinal. En el caso de los carcinomas de tipo intestinal, este modelo contempla el anterior modelo de Correa pero introduce, además, otras posibles secuencias que llevan al desarrollo de un tumor: la secuencia metaplasia intestinal - adenoma - carcinoma (A), la secuencia metaplasia intestinal - carcinoma (B) y una ruta *de novo* (C) (Figura 1.5) (Stock y Otto, 2005).

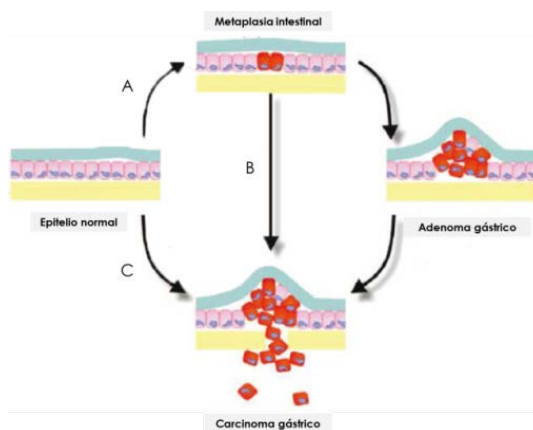


Figura 1.5
Proceso secuencial de la carcinogénesis en tumores gástricos de tipo intestinal, por tres vías diferentes. Adaptado de (Stock and Otto, 2005).

A nivel molecular, la inestabilidad en microsatélites (MSI), las mutaciones en *TP53*, una disminución en la expresión de *p27*, un aumento en la expresión de *ciclina-E*, y la transcripción del gen *c-Met* (*MET* or *MNNG HOS transforming gene*), están implicados en la transición de las lesiones precursoras hacia un fenotipo maligno; mientras que la presencia de LOH (*Loss of Heterozygosity*), las mutaciones en *APC* (*Adenomatous polyposis coli*), una completa pérdida de expresión de *p27* y *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*), la disminución de la expresión del receptor tipo I de TGF- β (*Transforming growth factor beta*), y la amplificación de *erbB-2* (*human epidermal growth factor receptor 2*), son características de estadios más avanzados de los tumores de tipo intestinal (**Figura 1.6**).

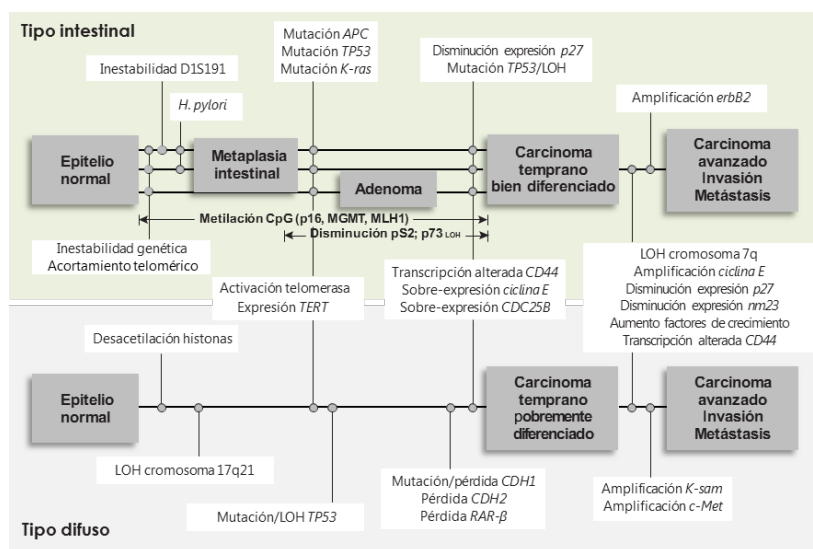


Figura 1.6
Modelo secuencial de los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis gástrica. Adaptado de (Grabsch and Tan, 2013).

Respecto a la carcinogénesis de los tumores gástricos de tipo difuso, se han descrito alteraciones moleculares implicadas en este proceso, en muchos casos, implicadas también en el desarrollo de tumores gástricos de tipo intestinal. Sin embargo, no se cuenta con una secuencia equivalente de eventos genéticos. La alteración molecular más frecuentemente asociada a los tumores gástricos de tipo difuso son los defectos en la función de E-cadherina. Esta falta de funcionalidad puede ser debida a mutaciones somáticas, a una pérdida de expresión, o bien, por la metilación del promotor del gen codificante para la E-cadherina (*CDH1*) (Oda et al., 1994). Como ya se ha mencionado anteriormente, individuos con mutaciones en la línea germinal de *CDH1* exclusivamente desarrollan tumores gástricos de tipo difuso. La pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 17p (*TP53*) también está implicada en el desarrollo de este tipo de tumores, mientras que la pérdida de expresión de *p27*, y la amplificación de genes como *K-sam* y *c-Met*, intervienen en su progresión (**Figura 1.6**).

1.1.4.1 MECANISMOS DE INESTABILIDAD GENÓMICA.

La inestabilidad genómica es un evento que tiene lugar en las primeras etapas del desarrollo de un carcinoma gástrico (César et al., 2006; Buffart et al., 2007). Actualmente, son tres los mecanismos de inestabilidad genómica descritos: la inestabilidad cromosómica (CIN, *chromosomal instability*), la inestabilidad en microsatélites (MSI, *microsatellite instability*) y la metilación de las islas CpG (CIMP, *CpG island methylator phenotype*). Estos mecanismos se corresponden con las distintas vías de desarrollo del cáncer gástrico, y no son totalmente independientes entre sí, sino que incluso se encuentran solapados en algunos casos (Hiyama et al., 2004; Ottini et al., 2006).

A. Inestabilidad cromosómica (CIN).

La inestabilidad cromosómica es el tipo más común de inestabilidad genómica en los tumores humanos, y se encuentra presente en el 60% de los tumores gástricos (Choi et al., 1998). Este mecanismo se caracteriza por la presencia de aberraciones cromosómicas tales como, modificaciones en el contenido de ADN por cambios en el número de copias de los cromosomas, un elevado nivel de presencia de pérdidas alélicas (LOH), y deleciones y/o amplificaciones de determinados genes. Estas alteraciones producen la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, dando lugar a la progresión de un cáncer a través de la conocida como vía supresora.

Los tumores gástricos CIN positivos, se caracterizan por la presencia de frecuentes pérdidas de heterocigosidad (LOH) en los *loci* situados en varios cromosomas: 1p, 3p, 4p, 5q, 7p, 8p, 8q, 9p, 12p, 13q, 17p, 18q, 20q, y 22q, segmentos entre los cuales se incluyen genes como *TP53* (cromosoma 17), *DCC*, *DPC4* (*Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4*), *SMAD2* (cromosoma 18), *APC*, *MCC* (*Mutated in Colorectal Cancer*) (cromosoma 5) y el gen *K-ras* (cromosoma 12) (Koo et al., 2004; Tamura, 2006).

Por otro lado, también se han definido mutaciones somáticas en genes supresores de tumores, como es el caso de *p16INK4a*, o el ya mencionado *TP53*, que se encuentra mutado en el 60% de los carcinomas gástricos. Las mutaciones en *APC* son las segundas más frecuentes en este tipo tumoral, y se detectan también en las lesiones precursoras, indicando su papel en la progresión a adenocarcinoma. Asimismo, se ha observado la pérdida

de expresión de genes codificantes para moléculas de adhesión como *CDH1* que, como ya se ha comentado, se encuentra implicado en el desarrollo del carcinoma gástrico de tipo difuso. Oncogenes como *c-Met*, *K-ras*, *c-erbB2*, o *K-sam* se sobre-expresan en este tipo tumoral, al igual que factores de crecimiento de la familia del EGF (*epidermal growth factor*), numerosas citoquinas como TGF (*transforming growth factor*), IL-1 e IL-8 (*interleukin 1 and 8*) o inhibidores de la apoptosis como BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) (Zheng et al., 2004; Jang y Kim, 2011).

B. Inestabilidad en microsatélites (MSI).

La presencia de inestabilidad en microsatélites es una característica comúnmente descrita en un porcentaje alto de los adenocarcinomas gástricos. Este tipo de inestabilidad genómica es característica de los tumores desarrollados por la vía del fenotipo mutador, y se define como la presencia de errores de replicación, resultantes de la inserción o deleción de unidades de repetición en secuencias cortas y repetitivas del ADN, denominadas secuencias microsatélite. Este tipo de alteración fue descubierta en 1993 asociada al cáncer de colon hereditario no poliposo (HNPCC) y, posteriormente, fue asociada a otros tipos tumorales, como el cáncer gástrico o el cáncer de endometrio (Aaltonen et al., 1993; Peltomäki et al., 1993; Thibodeau et al., 1993). En el caso del cáncer gástrico, la presencia de inestabilidad en microsatélites se ha asociado a los tumores de origen hereditario desarrollados en el contexto del síndrome de Lynch, y entre el 15 - 50% de los tumores gástricos de origen esporádico (Simpson et al., 2001).

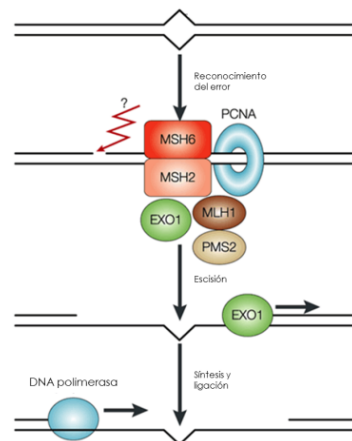


Figura 1.7
Funcionamiento del
complejo MMR
(mismatch repair).
Adaptado de
(Martin and
Scharff, 2002).

Los tumores desarrollados por la vía del fenotipo mutador presentan una elevada frecuencia de errores de replicación. Esto es debido a la deficiencia o inactivación de uno o varios de los genes que forman parte del sistema de reparación de errores de replicación (MMR, *Mismatch Repair*) (**Figura 1.7**) como son *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hMPS1* o *hPMS2* (Martin y Scharff, 2002). Este sistema se encarga de la reparación de errores que

ocurren de forma natural durante el proceso de replicación del ADN; por lo tanto, el déficit de funcionamiento del mismo se traduce en la presencia de nuevos alelos en el ADN del tejido tumoral, que no están presentes en el ADN del tejido no tumoral. Esta inactivación funcional se produce, bien por mutaciones en los genes *hMLH1* y *hMSH2*, que han sido descritas en el 12 - 15% de los tumores gástricos desarrollados por esta vía, o bien, por mecanismos de silenciamiento epigenético, como es el caso de la hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* que está presente en el 50% de los casos (Halling et al., 1999; Yamamoto et al., 1999b; Bacani et al., 2005).

La inactivación de los genes indicados en el párrafo anterior no constituye, por sí misma, un evento suficiente para el desarrollo de un tumor, sino que va seguida de una serie de alteraciones genéticas adicionales, generalmente por presencia de mutaciones de cambio del marco de lectura que provocan la inactivación de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis como *TGF-β*, *IGF1R*, *TCF4*, *RIZ*, *BAX*, *CASP-5*, *FAS*, *BCL10* y *APAF1* (Yamamoto et al., 1997b; Iacopetta et al., 1999; Schwartz et al., 1999; Yashiro et al., 2010); o bien, de genes implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica (*hMSH6*, *hMSH3*, *MED1*, *RAD50*, *BLM*, *ATR* y *MRE11*) (Ottini, 2004; D'Errico et al., 2009). Estas alteraciones favorecen la inestabilidad genómica y el desarrollo del tumor hacia un fenotipo maligno (Duval y Hamelin, 2002).

C. Metilación de las islas CpG (CIMP).

El silenciamiento epigenético de genes relacionados con el proceso tumorigénico por metilación de las islas CpG, es una de las alteraciones genéticas más importantes implicadas en el desarrollo del cáncer (Baylin, 2005). Este tipo de inestabilidad genómica se caracteriza por un grado anormal de hipermetilación en las islas CpG, localizadas en los promotores de genes implicados en el proceso tumorigénico, lo que conlleva a su silenciamiento transcripcional. Esta nueva vía carcinogénica está presente en el 50% de los tumores gástricos, y fue asociada a este tipo tumoral por primera vez en 1999 (Toyota et al., 1999; Oue et al., 2003). Este tipo de alteraciones constituye un importante mecanismo para la génesis del cáncer de estómago, ya que se han detectado en las lesiones que preceden a un adenocarcinoma gástrico invasivo, y su acumulación se incrementa de forma paralela al estadiaje tumoral (Kang et al., 2003; Lee et al., 2004; Oue et al., 2006).

Los tumores CIMP positivos se caracterizan por la presencia de metilación en múltiples genes relacionados con tumores, como *APC*, *CDH1*, *MLH1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, y *RUNX3*. La inactivación de genes supresores de tumores, como *CDH1* o *PTEN*, se ha asociado a una peor supervivencia de los pacientes, e intervalos libre de enfermedad más cortos (Kang et al., 2002; Graziano et al., 2004). Sin embargo, tumores con un marcado fenotipo metilador se asocian a una mejor supervivencia, por lo que la relación entre esta vía y las variables clínicas no está aún bien determinada (An et al., 2005).

Un caso especial es el del gen *hMLH1* que, como se ha comentado anteriormente, se encuentra silenciado por hipermetilación de su promotor en el 50% de los tumores gástricos con inestabilidad en microsatélites. Este hecho hace pensar en la asociación entre estas dos vías carcinogénicas ya que, tal y como se ha demostrado, el porcentaje de metilación de genes como *p16INK4a*, *CDH1*, y el propio *hMLH1* es mayor en el caso de tumores que presentan una elevada tasa de inestabilidad en microsatélites. También se ha encontrado mayor proporción de tumores CIMP-H (*CIMP-high*, tumores con metilación en más del 50% de los genes analizados) entre los casos que presentan inestabilidad en microsatélites, que entre los tumores gástricos sin inestabilidad en microsatélites (Carvalho et al., 2003; Kim et al., 2003).

1.2 TELÓMEROS Y TELOMERASA

Los telómeros son complejos ribonucleoproteicos situados en los extremos de los cromosomas, que contienen múltiples repeticiones en tándem de una secuencia corta y repetitiva de ADN. Su papel esencial es proteger los extremos de los cromosomas de posibles fusiones entre sus extremos, y asegurar la correcta segregación del material genético durante la división celular. Fueron descubiertos por Herman Müller en 1938, quien propuso la existencia de unas estructuras especiales al final de los cromosomas, necesarias para el mantenimiento de su integridad, a las que denominó telómeros (Del griego “telos” final y “meros” parte) (Müller, 1938). Más tarde, fue Barbara McClintock quien les otorgó la función de proteger a los cromosomas de posibles fusiones entre sus extremos por frecuentes roturas producidas durante la mitosis de las células (McClintock, 1941).

1.2.1 ADN TELOMÉRICO.

El ADN telomérico humano está formado por una secuencia corta y repetitiva de nucleótidos, cuya hebra 3' posee un alto contenido en guanina (también llamada hebra rica en guanina). Esta hebra está compuesta por repeticiones 5'TTAGGG, y su hebra complementaria 5' o rica en citosina, está formada por la repetición 5'CCCTAA (Figura 1.8). En el caso de los humanos, los telómeros miden entre 5 - 15 kilobases (kb), pero tanto la secuencia que los forman, como su longitud, varía entre diferentes organismos (Meyne et al., 1989).

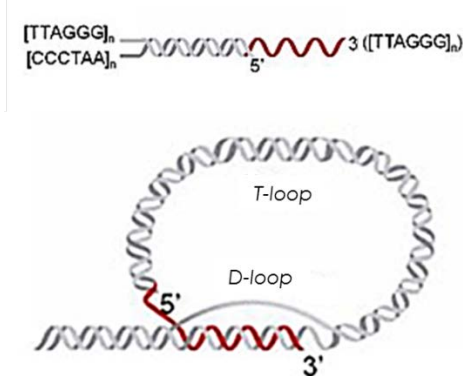
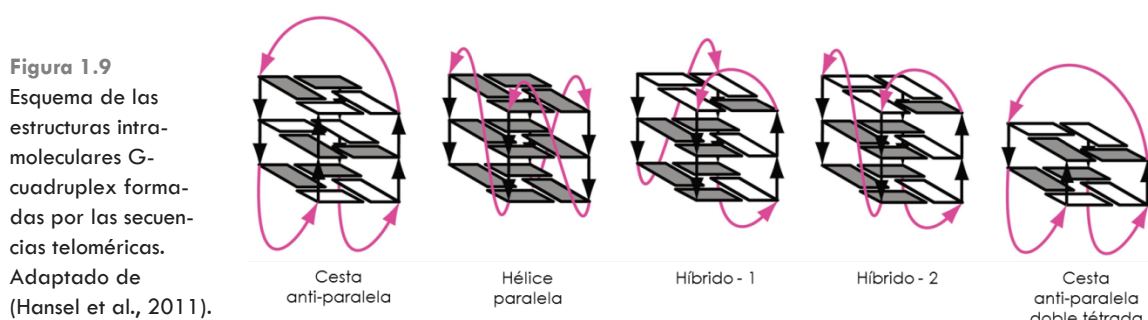


Figura 1.8
Estructura del ADN telomérico y formación del T-loop en los extremos de los cromosomas. Adaptado de (Pinto et al., 2011).

Estructuralmente, los telómeros contienen una región compuesta por ADN de doble cadena, que comprende su mayor parte, y una región formada por una hebra simple de ADN de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, al final de la hebra rica en guani-

na (Wright et al., 1997), la cual a su vez forma el extremo 3' de los cromosomas. Estas zonas ricas en guanina interaccionan entre ellas mediante puentes de hidrogeno de Hoo-gsteen, formando estructuras que se pliegan entre sí, para formar una estructura más compleja denominada G-cuadruplex en diferentes conformaciones (Hansel et al., 2011) (**Figura 1.9**). La formación de estas estructuras tiene como función la protección del telómero, evitar fenómenos de recombinación, y la inhibición de la extensión del telómero dependiente de telomerasa (Lipps y Rhodes, 2009).



El ADN telomérico, a su vez, se pliega sobre sí mismo formando unas estructuras en forma de bucle denominadas *T-loops*, en las que el extremo saliente de la hebra rica en guanina invade la doble cadena de ADN telomérico, formando un segundo bucle de desplazamiento en el lugar de invasión, denominado *D-loop* (**Figura 1.8**) (Pinto et al., 2011). Esta nueva estructura se mantiene estable gracias a la presencia de varias subunidades del complejo *shelterin*, el cual participa incluso en su formación, a través de algunas de sus proteínas. La presencia de estos *T-loops* también protege los extremos de los cromosomas de la degradación, o de la acción de los mecanismos de reparación del ADN, así como de la acción de telomerasa (Griffith et al., 1999; Lange, 2004).

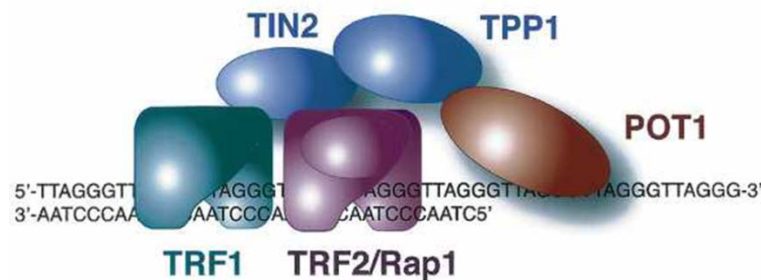
1.2.2 PROTEÍNAS DE UNIÓN AL TELÓMERO: *SHELTERINS*.

Los telómeros están unidos a un complejo multiproteico compuesto por seis proteínas: TRF1, TRF2, TIN2, POT1, RAP1 y TPP1, denominado complejo *shelterin* (**Figura 1.10**). Juntas, estas seis proteínas tienen un papel fundamental en la protección de los extremos de los cromosomas, y en la regulación de la actividad telomerasa (Palm y Lange, 2008).

Las proteínas TRF1 y TRF2 (*telomeric repeat binding factors 1 and 2*) hibridan directamente con la doble hebra del ADN telomérico, pero de forma independiente entre ellas.

En el caso de TRF1, su secuencia C-terminal reconoce específicamente al ADN telomérico, y tras una dimerización en el extremo N-terminal, se une firmemente al telómero. Ambas proteínas, actúan como reguladores negativos de la longitud telomérica, pero TRF2 participa, además, en la estabilización de la hebra rica en guanina del extremo 3' del ADN telomérico, y es imprescindible para la prevención de las fusiones de los extremos de los cromosomas (Smith y Lange, 1997; Muñoz et al., 2006). Ambas proteínas impiden la acción de la enzima telomerasa sobre el telómero, e inducen la puesta en marcha de las rutas de señalización en respuesta al daño en el ADN, ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) y ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), cuando la funcionalidad del complejo *shelterin* se encuentra disminuida (Martínez y Blasco, 2010). También se ha descrito un cierto papel oncogénico para TRF2, ya que la sobre-expresión de esta proteína, junto con deficiencias en la telomerasa, acelera la carcinogénesis epitelial debido a la presencia de un alto grado de inestabilidad cromosómica (Blanco et al., 2007).

Figura 1.10
Representación estructural de las seis subunidades que conforman el complejo *shelterin*, en unión al ADN telomérico.
Adaptado de (de Lange, 2005).



La proteína de unión al telómero, POT1 (*protector of telomeres 1*), se une directamente a la hebra 3' del ADN telomérico y actúa como regulador de la longitud telomérica, activando o inhibiendo a telomerasa, dependiendo de la posición que ocupe en el extremo sobresaliente de dicha hebra. Esta proteína contribuye también a la protección del telómero, evitando el reconocimiento de dicha hebra por parte de los sistemas de reparación del ADN (Baumann y Price, 2010).

TPP1 (*tripeptidyl-peptidase 1 preproprotein*) se une a TIN2 y POT1 a través de su dominio C-terminal y su dominio central, respectivamente. La unión entre TPP1 y POT1 es constante y necesaria, para la localización de POT1 en los telómeros, y para la interacción con telomerasa, ya que TPP1 presenta un dominio de unión a esta enzima. Esto sugiere un papel en la atracción de telomerasa hacia el final de los cromosomas (Liu et al., 2004; Xin et al., 2007).

Por su parte, TIN2 (*TRF1-interacting nuclear factor 2*) se une a las proteínas TRF1 y TRF2 a través de dominios independientes y, a su vez, recluta al complejo TPP1-POT1, constituyendo así un puente de unión entre diferentes proteínas del complejo *shelterin* (Kim et al., 2004). Su delección resulta en una disminución de la localización telomérica de todos los componentes del complejo, y en un incremento de la respuesta al ADN dañado mediada por ATR. TIN2 es el único componente del complejo para el que se han descrito mutaciones relacionadas con una enfermedad, la diskeratosis congénita (Yang et al., 2011).

Finalmente, RAP1 (*represor/activator 1*) forma un complejo con TRF2, que ayuda a su reclutamiento hacia el telómero. Su delección no tiene un efecto dramático en la longitud de los telómeros, sin embargo, actúa evitando fenómenos como la recombinación, y la fragilidad del telómero (Li et al., 2000; Sfeir et al., 2010). Además, RAP1 controla la expresión génica (incluyendo el silenciamiento de la región subtelomérica) por unión a localizaciones extra-teloméricas ricas en repeticiones TTAGGG (Martinez et al., 2010).

1.2.2.1 PROTEÍNAS ASOCIADAS AL COMPLEJO *SHELTERIN*.

Además de todas las proteínas descritas anteriormente, este complejo necesita de la interacción transitoria con una serie de factores para ejercer su papel sobre la función telomérica (Lange, 2005). Las poli(ADP)-ribosa polimerasas, tankirasa 1 y 2, se unen a la proteína telomérica TRF1, a través de una interacción con su dominio N-terminal, provocando una disminución de la afinidad de TRF1 por el ADN telomérico y su posterior degradación, induciendo así la elongación del telómero (Cook et al., 2002). PINX1 (*PIN2/TERF1 interacting telomerase inhibitor 1*) interacciona simultáneamente con TRF1 y la subunidad catalítica de la enzima telomerasa, proporcionando la unión física de la enzima con TRF1 (Zhou y Lu, 2001).

Otros factores se encuentran asociados a la proteína TRF2 y, generalmente, están relacionados con los sistemas de reparación del ADN, o bien con el proceso de replicación. Apollo es una nucleasa cuya unión al complejo *shelterin* es totalmente dependiente de TRF2. Esta nucleasa contribuye a la formación de una estructura terminal durante la replicación del ADN, que evita la activación de ATM, y resiste a las uniones de extremos cromosómicos (Sarthy y Baumann, 2010).

El complejo MRN, formado por MRE11, RAD50 y NBS1, tiene un papel esencial en la activación de la ruta ATM en respuesta a cierto tipo de daño en el ADN, y también contribuye a la formación del extremo 3' de los telómeros (Deng et al., 2009a). Se ha descrito que mutaciones en alguno de los componentes de este complejo generan una disfunción telomérica por eliminación de TRF2. La proteína MCPH1 (*microcephalin 1*) interacciona con TRF2, y está implicada en la respuesta al ADN dañado. Además, participa en las rutas ATM y ATR reclutando a otros factores como MDC1, NSB1 y RAD1 en las zonas dañadas (Mohammad y Yaffe, 2009).

Las proteínas WRN (*Werner síndrome RecQ helicase-like*), BLM (*Bloom síndrome RecQ helicase-like*), y la endonucleasa FEN1, interaccionan con la proteína del complejo shelterin TRF2. Estas proteínas se encuentran implicadas en el procesamiento de los telómeros durante la fase S del ciclo celular, y una disminución de su actividad provoca la replicación incompleta de los telómeros (Opresko et al., 2002; Saharia et al., 2010). El complejo de reconocimiento del origen de replicación ORC (*origin recognition complex*) también es esencial para la replicación del ADN, y es reclutado en los telómeros por TRF2.

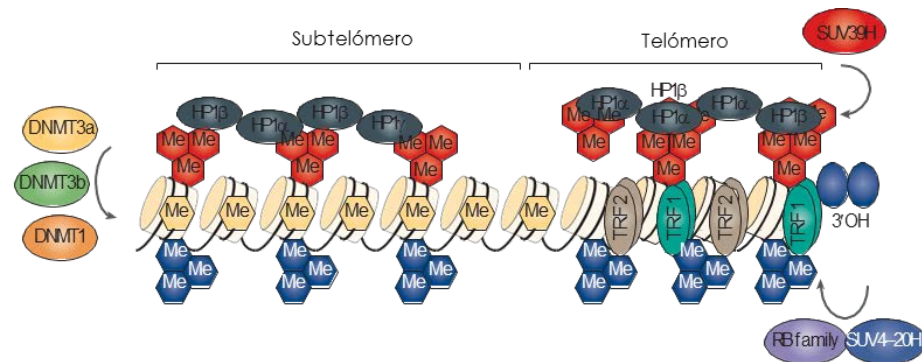
El heterodímero Ku70/Ku80 participa en los procesos de recombinación no homóloga. La presencia de TRF2, unida al ADN telomérico, y su papel en la formación del *T-loop*, son importantes para proteger los extremos de los cromosomas del reconocimiento del complejo Ku (Ribes-Zamora et al., 2013). Otros factores, como las proteínas PNUTS (*phosphatase nuclear targeting subunit*) o el complejo de nucleasas ERCC1-XPF (*excision repair cross complementing 1 / xeroderma pigmentosum group F*) también están implicados en la regulación de la longitud telomérica y en su integridad (Zhu et al., 2003; Landsverk et al., 2010).

1.2.3 LA HETEROCROMATINA TELOMÉRICA.

La estructura de la cromatina telomérica está formada por nucleosomas, y cada uno de estos nucleosomas está constituido por una secuencia de ADN rodeada de un conjunto de histonas que sufren modificaciones específicas (Blasco, 2005) (**Figura 1.11**). La presencia de histonas es una marca epigenética característica de la heterocromatina constitutiva, lo que indica la presencia de un nivel superior de control de la longitud y estructura telomérica (Schoeftner y Blasco, 2009).

Al igual que la heterocromatina constitutiva, los telómeros humanos tienen la capacidad de silenciar transcripcionalmente a genes próximos a la región telomérica, a través de lo que se conoce como “efecto de posición telomérico” (*TPE, telomere position effect*) (Baur et al., 2001; Koering et al., 2002). Además, las regiones teloméricas y subteloméricas presentan tri-metilación de las histonas H3K9 y H4K20, debido a la acción de las metiltransferasas (HMTasas) SUV39H1 y SUV39H2, en el caso de H3K9, y SUV4-20H1 y SUV4-20H2, en el caso de H4K20.

Figura 1.11
Modificaciones epigenéticas de las regiones teloméricas.
Adaptado de (Blasco, 2007).



Estas regiones también son ricas en HP1 (*heterochromatin protein 1*) gracias a su afinidad con los residuos H3K9 tri-metilados, que la reclutan hacia el telómero, donde juega un papel importante en el mantenimiento de la cromatina en un estado “compacto” (Lachner et al., 2001; García-Cao et al., 2004). Proteínas de la familia del retinoblastoma (RB1, *retinoblastoma 1*, RBL1 y RBL2, *retinoblastoma-like 1 and 2*) también participan en la formación de la heterocromatina telomérica, ya que interaccionan con las metiltransferasas SUV4-20H1 y SUV4-20H2, manteniendo el estado tri-metilado de la histona H4K20 (Gonzalo et al., 2005).

Otra característica propia de la heterocromatina constitutiva es la presencia de metilación en el ADN. Esta marca epigenética es una importante modificación de la cromatina, y está implicada en los procesos de regulación transcripcional, en la regulación del acceso de factores de unión al ADN, y en el control de las actividades de remodelación de la cromatina (Jones y Baylin, 2002). En el caso de los telómeros, no pueden sufrir este tipo de modificaciones debido a la falta de islas CpG en la secuencia telomérica, sin embargo, las secuencias de las regiones subteloméricas si pueden ser metiladas (Tommerup et al., 1994; Steinert et al., 2004). La presencia de metilación en esta región actúa como un mecanismo secundario para reforzar el silenciamiento génico por TPE (Pedram et al., 2006). Otro mecanismo de control de la TPE es su regulación a través de las proteínas TRF1 y

TIN2, que interaccionan con HP1. Se ha descrito que una sobre-expresión de TRF1 produce la disminución de TPE (Koering et al., 2002), y aumenta cuando los telómeros son alargados (Baur et al., 2001), pero el mecanismo exacto aún no se conoce.

1.2.3.1 REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LOS TELÓMEROS.

La desorganización de las histonas presentes en la heterocromatina telomérica, así como las modificaciones en el ADN de las regiones subteloméricas, se relacionan con una pérdida del control de la longitud telomérica (Blasco, 2007). En el caso de la modificación de histonas, se ha visto que la falta de las HMTasas SUV39H1 y SUV39H2, o la falta de los tres miembros de la familia retinoblastoma (Rb), provocan una disminución de la trimetilación de H3K9 y de H4K20, respectivamente. Este evento se acompaña de una elongación aberrante de los telómeros (García-Cao et al., 2002; 2004; Gonzalo et al., 2005), y puede producirse por alteraciones en la funcionalidad de los factores reguladores de la longitud telomérica, como TRF1, TRF2, y POT1, como consecuencia de los cambios en la heterocromatina telomérica (Ancelin et al., 2002; Loayza y Lange, 2003).

Por otro lado, cambios en la metilación del ADN, tanto de forma global como en las regiones subteloméricas, son acompañados de un aumento en la longitud telomérica, siempre y cuando no se produzca la pérdida de metilación en las histonas. La desmetilación de las regiones subteloméricas en células carentes de ADN metiltransferasas, produce un incremento de los fenómenos de recombinación homóloga entre secuencias teloméricas, y su activación posterior revierte esta situación. Por lo tanto, se ha identificado a la metilación del ADN subtelomérico como un posible regulador de los mecanismos de mantenimiento de la longitud telomérica en las células, alternativos a telomerasa (Gonzalo et al., 2006).

1.2.3.2 ARN TELOMÉRICO (TERRA).

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la hebra rica en citosina de los telómeros es transcrita por la ARN polimerasa II, dando como resultado moléculas de ARN no codificante que contienen la repetición 5'-UUAGGG-3', denominados TelRNA/TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*). Esta transcripción ha sido detectada en diferentes orga-

nismos, demostrando un alto grado de conservación a lo largo de la evolución (Azzalin et al., 2007; Schoeftner y Blasco, 2008).

Las moléculas de TERRA se transcriben a partir de las regiones subteloméricas hacia el extremo de los cromosomas, finalizando en las repeticiones teloméricas. Son moléculas de longitudes muy heterogéneas, que pueden ir desde los 100 nucleótidos hasta las 9 kilobases (kb). El extremo 5' se encuentra flanqueado por una 7-metilguanosina (m^7G) (Porro et al., 2010), y una pequeña fracción del total de moléculas, aproximadamente un 7%, presenta una cola de poli-A en su extremo 3' (Azzalin et al., 2007; Schoeftner y Blasco, 2008).

A. Localización de TERRA en los telómeros.

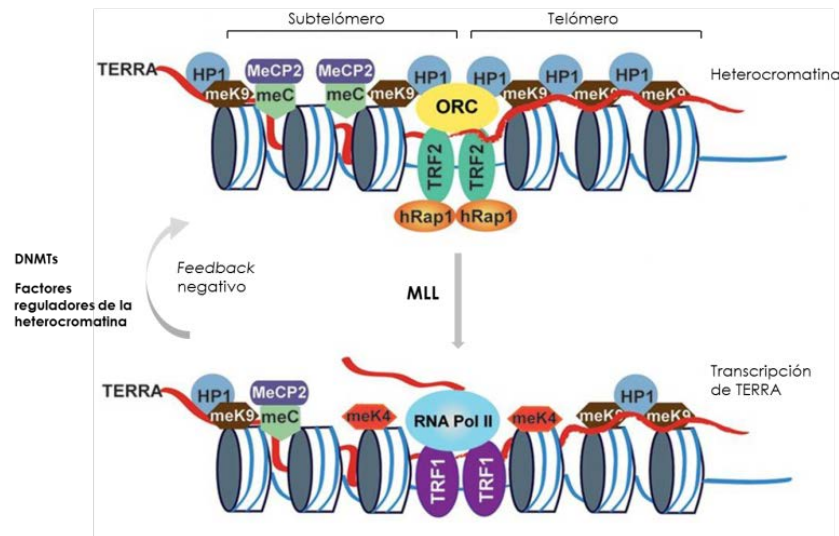
Las moléculas de TERRA se localizan mayoritariamente en el núcleo, una fracción de forma asociada a la cromatina, y otra fracción en el nucleoplasma (Porro et al., 2010). Estas moléculas se acumulan en *foci* en la periferia del núcleo, y se colocan en los extremos de los cromosomas de forma transitoria durante la fase S del ciclo celular.

TERRA se asocia con diferentes proteínas de unión a telómeros, como TRF1 y TRF2, y diferentes miembros de la familia de las ribonucleoproteínas hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*). Estas proteínas influyen en su localización, de forma que las células que sobre-expresan una proteína mutante de TRF2 muestran una localización difusa de TERRA, y la delección de factores como UPF1, EST1A, o SMG1, causan un aumento de su localización en los telómeros. Por lo tanto, TERRA no es un constituyente estable de la heterocromatina telomérica (Deng et al., 2009b; López et al., 2010). Su localización en los telómeros también parece estar influenciada por la formación de híbridos ADN/ARN, que generan estructuras en G-cuádruplex gracias a su alto contenido en guanina en su extremo 3' (Randall y Griffith, 2009), y que parecen influir en su unión a la proteína TRF2 (Biffi et al., 2012). Por lo tanto, la localización de las moléculas de TERRA está estrechamente regulada en los extremos de los cromosomas, y esto influye directamente en sus funciones.

B. Regulación de la transcripción de TERRA.

La región promotora de TERRA se ha identificado en las islas CpG presentes en las regiones subteloméricas. Estas regiones, albergan una serie de repeticiones conservadas de 61, 29 y 37 pares de bases; sin embargo, el promotor específico de TERRA aún no ha sido identificado (Nergadze et al., 2009).

Figura 1.12
Modelo esquemático que muestra los cambios en la heterocromatina telomérica que modulan la transcripción de TERRA. Adaptado de (Deng et al., 2010).



Se han propuesto varios factores que influyen en la regulación transcripcional de TERRA, pero poco se conoce sobre ellos (**Figura 1.12**) (Deng et al., 2010). CTCF (*chromatin organization factor*) y cohesina hibridan en la región subtelomérica de forma adyacente a las islas CpG, participando en su expresión y ayudando a reclutar a la ARN polimerasa II hacia el promotor de TERRA (Deng et al., 2012a). Además, algunas modificaciones postraduccionales, como la desacetilación de histonas de la heterocromatina telomérica, influyen en la regulación de TERRA, como se ha demostrado en levaduras en las histonas H3 y H4 gracias a la enzima desacetilasa Sir2 (Maicher et al., 2012), y en ratones deficientes en HMTasas (Schoeftner y Blasco, 2008). Pero la metilación del ADN de las regiones subteloméricas parece tener una mayor influencia en este proceso de regulación. Se ha visto que un elevado nivel de metilación en las islas CpG de la región promotora de TERRA en varias líneas celulares de origen cancerígeno y en fibroblastos primarios, se correlaciona de forma negativa con los niveles de TERRA (Nergadze et al., 2009).

Estudios más recientes sugieren que la longitud telomérica puede contribuir a la expresión de los niveles de TERRA, pero los resultados son contradictorios. Arnoult *et al.* también han demostrado que un incremento en la densidad de la trimetilación de H3K9, y el reclutamiento de la subunidad HP1- α , genera una disminución de los niveles de TERRA de una manera dependiente de la longitud telomérica (Arnoult *et al.*, 2012). Sin embargo, otros estudios demuestran que no existe correlación alguna entre la longitud de los telómeros de diferentes líneas tumorales humanas, con cambios en la transcripción de TERRA (Smirnova *et al.*, 2013).

C. Funciones de TERRA.

Se han propuesto varias funciones de TERRA en relación al mantenimiento de los telómeros gracias a su participación en la formación de la heterocromatina telomérica y en la regulación de la actividad telomerasa. Algunos estudios en levaduras sugieren que un aumento de los niveles de TERRA provoca el acortamiento telomérico del propio telómero en el que se transcribe, independientemente de la actividad telomerasa, pero en células de mamíferos no ha sido demostrado (Pfeiffer y Lingner, 2012).

La interacción entre TERRA y telomerasa se identificó por primera vez en células HEK293T por inmunoprecipitación de hTERT en un extracto nuclear. Se cree que esta unión se produce debido a la afinidad de la secuencia de TERRA con el componente ARN de telomerasa (hTER) gracias a su similitud con el ADN telomérico, produciéndose una inhibición de tipo competitivo, o bien, por interacción con la subunidad catalítica hTERT, induciendo una inhibición alostérica de la enzima (Redon *et al.*, 2010). Sin embargo, la evidencia de la participación de TERRA como inhibidor de telomerasa *in vivo*, no se ha podido demostrar todavía. Varios estudios analizan esta asociación, obteniéndose resultados contradictorios. Un análisis en células tumorales telomerasa positivas revela bajos niveles de TERRA en comparación a las células normales, pero en otros estudios también se demuestra una mayor expresión de TERRA en otros tipos tumorales (Ng *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2012b). Un estudio en células de ratón deficientes en DNMT1 y DNMT3b demuestra que presentan el mismo nivel de actividad telomerasa aquellas células que expresan niveles altos de TERRA y las que expresan niveles bajos de TERRA. De esta forma, se sugiere que los niveles de TERRA no influyen en la actividad telomerasa global de la célula (Farnung *et al.*, 2012).

Recientes estudios apuntan hacia un papel de TERRA en la estabilización de la cromatina telomérica. TERRA ha sido asociado con diversas proteínas de la heterocromatina, tales como H3K9, HP1, y el complejo del origen de replicación ORC, el cual se encarga de regular la formación de la heterocromatina en los telómeros. El mecanismo propuesto se desarrolla a través de un papel demostrado como puente entre TRF2 y ORC1, estabilizando la unión entre ambas proteínas y promoviendo el reclutamiento de HP1 y H3K9 trimetilada hacia los telómeros. Asimismo, se ha propuesto que la delección de TERRA se correlaciona con una pérdida de la unión de H3K9me3 y ORC con los telómeros, y un incremento en la acumulación de TIFs (*telomere dysfunction-induced foci*), sugiriéndose que TERRA facilita la formación de la heterocromatina y el mantenimiento de su estructura (Deng et al., 2009b). Por último, TERRA parece preservar la integridad genómica gracias a que favorece la unión correcta de POT1 en el extremo de los telómeros tras la replicación del ADN (Flynn et al., 2011).

1.2.4 IMPORTANCIA DE LOS TELÓMEROS DURANTE LA REPLICACIÓN.

Los telómeros protegen la integridad estructural de los extremos de los cromosomas, de un acortamiento sucesivo resultante de un fallo en la replicación de los extremos de las moléculas de ADN lineal, denominado “problema de la replicación terminal” (Watson, 1972; Olovnikov, 1973).

Durante la replicación del ADN, la síntesis de la cadena conductora es continua. Sin embargo, debido a que las ADN polimerasas convencionales son unidireccionales, son necesarios *primers* que proporcionen el extremo 3' - OH para iniciar la síntesis de la hebra retardada. Esta síntesis se produce de manera discontinua, en forma de pequeños fragmentos de ADN denominados fragmentos de Okazaki. Una vez completada la síntesis, los *primers* son eliminados y los fragmentos de ADN se unen entre sí, mediante enzimas ligasas. La eliminación del *primer* del extremo 5' genera una pérdida de material genético respecto a la hebra parental. En el caso de la hebra conductora, ésta requiere de la digestión con enzimas exonucleasas para generar el extremo 3' sobresaliente, necesario para la estructura telomérica (Cong et al., 2002). Como resultado, en cada ciclo de replicación el cromosoma pierde entre 50-200 pares de bases de ADN telomérico, impidiendo así la pérdida de información genética. Esta reducción en la longitud telomérica actúa como un “reloj mitótico” que puede monitorizar la historia replicativa de las células. Cuando los

telómeros son críticamente acortados, se desencadena una parada permanente del crecimiento, conocida como senescencia replicativa (Muraki et al., 2012).

1.2.5 MECANISMOS DE MANTENIMIENTO TELOMÉRICO.

Para contrarrestar el desgaste gradual de los telómeros que acompaña a la replicación del ADN, las células cancerígenas deben emplear mecanismos compensatorios que impidan el acortamiento de sus telómeros. Mientras que, aproximadamente, el 90% de los cánceres humanos lo consiguen mediante la reactivación de la enzima telomerasa, el 10% restante utiliza mecanismos de mantenimiento de la longitud telomérica basados en la recombinación homóloga, conocidos como mecanismos ALT (*alternative lengthening of telomeres*) (Bryan et al., 1997).

1.2.5.1 REACTIVACIÓN DE TELOMERASA.

Telomerasa es una enzima formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico con actividad transcriptasa inversa, que se encarga del mantenimiento de la longitud de los telómeros por adición de repeticiones de la secuencia telomérica TTAGGG en los extremos de los cromosomas. Esta enzima fue descubierta por Carol Greider y Elizabeth Blackburn en 1985 en un extracto nuclear de *Tetrahymena*, en el que identificaron una particular actividad enzimática capaz de sintetizar las repeticiones teloméricas TTGGGG de este organismo, a la que denominaron telomerasa (Greider y Blackburn, 1985).

La telomerasa está formada por una subunidad catalítica denominada hTERT (*telomerase reverse transcriptase*), un componente ARN conocido como hTER (*human telomerase RNA*) y una serie de proteínas específicas accesorias a telomerasa, que son requeridas para su correcto funcionamiento (Zhang et al., 2011; Armanios y Blackburn, 2012) (**Figura 1.13**). El componente hTERT es codificado por un gen de copia única situado en el brazo corto del cromosoma 5 (5p15.33). Contiene cuatro dominios diferentes, basados en sus distintas funciones. El dominio N-terminal es esencial para telomerasa (TEN, *essential telomerase N-terminal domain*) e interacciona con la hebra simple del ADN telomérico; el dominio TRBD (*TERT RNA-binding domain*) que contiene múltiples dominios para la unión de hTER; el dominio transcriptasa reversa (RT, *reverse transcriptase domain*), responsable de la actividad enzimática; y el dominio CTE (*C-terminal extension*), que participa en nu-

merosas interacciones proteína-proteína y regula la localización y la actividad de la enzima (Zvereva et al., 2010).

Telomerasa mantiene un nivel de actividad enzimática prácticamente indetectable en la mayoría de células somáticas, pero sí se encuentra activa en células de la línea germinal, células epiteliales, y células hematopoyéticas, y altamente activa en aproximadamente el 90% de las células tumorales (Blasco, 2005; Shay y Wright, 2006). Esta diferente activación entre los tejidos no tumorales y los tejidos tumorales, se debe a las diferencias de expresión del componente enzimático *hTERT*. Las otras subunidades de telomerasa se expresan de forma constitutiva en ambos tejidos (Kyo et al., 1998; Takakura et al., 1998; Kyo et al., 1999). Tras la clonación del promotor del gen *hTERT*, se vio que la actividad transcripcional estaba aumentada en células tumorales, y silenciada en las células normales. Además, se identificaron numerosos lugares de unión de factores que regulaban su transcripción (Takakura et al., 1999).

Factores de transcripción como Myc, Sp1 (*specificity protein 1*) y la proteína AP-2 (*activating protein 2*) se comportan como activadores transcripcionales del promotor de *hTERT*. HIF-1 (*hipoxia-inducible factor-1*), que regula la expresión de varios genes relacionados con la angiogénesis y el metabolismo energético, también se ha visto implicado en un aumento de la transcripción de *hTERT* en casos de hipoxia inducida por un aumento de su expresión. Sin embargo, algunos estudios demuestran que HIF-1 disminuye la expresión de genes activados por Myc, incluyendo *hTERT*. HIF-2 también ha sido relacionado con la regulación del promotor de *hTERT*, pero los resultados también han sido contradictorios dependiendo del tipo celular (Koshiji et al., 2004; Lou et al., 2007).

Algunas hormonas, especialmente los estrógenos, activan la transcripción de *hTERT* mediante mecanismos postranscripcionales por acumulación de *hTERT* a través de su fosforilación (Kimura et al., 2004), mientras que los andrógenos lo hacen, pero no a través del promotor (Guo et al., 2003). El factor de crecimiento epitelial EGF activa el promotor de *hTERT* a través de un sitio de unión en el promotor (Maida et al., 2002). Sin embargo, otro factor de crecimiento como es TGF- β , reprime la transcripción de *hTERT* de forma indirecta por la disminución de la expresión de Myc (Li et al., 2006). También se ha visto que oncoproteínas como HER2/Neu, Ras, y Raf, activan la expresión de *hTERT* en células normales a través del factor de transcripción ER81 (Goueli y Janknecht, 2004). Otras pro-

teínas como p53, forman un complejo con Sp1, WT1 (*Wilms' tumor 1*), y MZF-2 (*myeloid-specific zinc finger protein-2*), que reprime la actividad transcripcional de *hTERT* mediante su unión a sitios específicos del promotor. Todos estos factores son considerados reguladores negativos de *hTERT*, y por lo tanto, dificultan la actividad telomerasa, sobretodo en las células normales (Kyo et al., 2008).

La regulación epigenética del promotor de *hTERT* también ha sido establecida como mecanismo para la regulación de su expresión. La modificación de histonas, incluyendo tanto la acetilación como la desacetilación, y la metilación de las islas CpG presentes en distintas regiones del promotor regulan la estructura de la cromatina y tienen efectos en la transcripción del gen *hTERT*. La inhibición de enzimas HDAC (*histone desacetylases*) a través de Sp1, es el mecanismo responsable del silenciamiento génico de *hTERT* en células normales. Sp1 es un potente activador de la transcripción de *hTERT*, posiblemente por su interacción también con factores con actividad acetilasa (*HATs*, *histone acetylases*) (Cong y Bacchetti, 2000; Dessain et al., 2000).

El componente ARN (hTER) de telomerasa actúa como molde para la adición de la secuencia telomérica TTAGGG en el extremo 3' del ADN telomérico. Su transcripción por la

ARN polimerasa II, y su posterior procesamiento, genera un transcrito de 451 nucleótidos entre los que contiene una secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' que codifica para las repeticiones teloméricas (Feng et al., 1995). Posee una conservada estructura secundaria con cuatro dominios estructurales: un dominio central que incluye la secuencia molde, la caja H/ACA situada en el extremo 3' en la que está incluido el dominio CR7, que forma una horquilla de terminación, y las regiones 4 y 5 (CR4/CR5) que forman el centro catalítico de la enzima (Chen et al., 2000).

El componente hTER interacciona con hTERT mediante dos contactos independientes, uno a través del dominio central, y otro a través del dominio CR4/CR5 (Chen et al.,

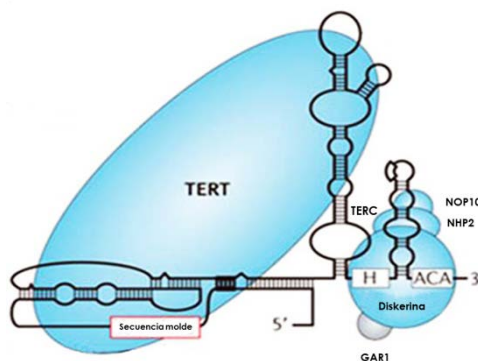


Figura 1.13
Representación estructural del componente hTERT y hTER de telomerasa y las proteínas accesorias. Adaptado de (Armanios and Blackburn, 2012).

2002). Ambos dominios, junto con hTERT, son las subunidades mínimas necesarias para reconstituir la actividad telomerasa *in vitro* (Autexier et al., 1996); sin embargo, *in vivo*, son necesarios una serie de factores accesorios para la funcionalidad completa de la enzima.

El dominio H/ACA es esencial para la estabilidad de hTER. Este dominio forma un complejo ribonucleoproteico (H/ACA - RNP) en unión con las proteínas diskarina, NHP2 y NOP10 tras lo que se inicia el proceso de biosíntesis de hTER. Este heterotrímero también se une a la proteína NAF1, que interacciona con la ARN polimerasa II, promoviendo la transcripción de las ribonucleoproteínas (RNP). Tras la maduración de estos complejos, NAF1 se intercambia por GAR1 y transforma al complejo en biológicamente funcional (Darzacq et al., 2006; Egan y Collins, 2010). Esta región contiene también la presencia de un dominio CAB (*Cajal body*) en la zona identificada como dominio CR7. La composición de estos complejos ribonucleoprotéicos los identifica como miembros de la familia de los scaRNA (*small Cajal body RNAs*). La unión de la proteína TCAB1 (*telomerase Cajal body protein 1*) con el dominio CAB se encarga del transporte de TER-H/ACA-RNP, y de la localización y ensamblaje de telomerasa en el interior de los cuerpos de Cajal (Tycowski et al., 2009; Venteicher et al., 2009).

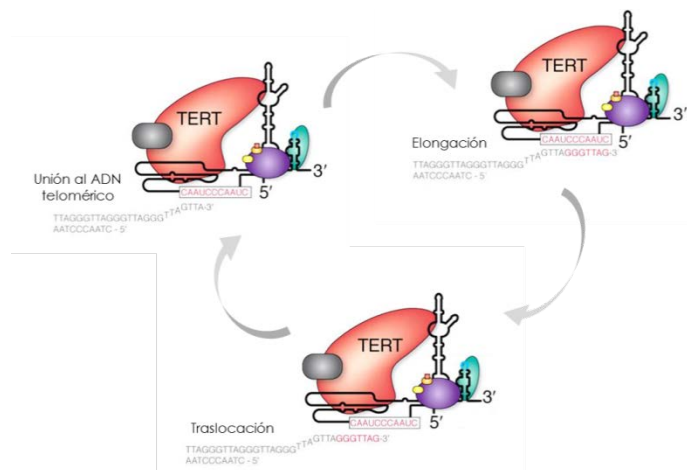
Telomerasa se regula también de forma dependiente del ciclo celular, para lo que necesita dos helicasas dependientes de ATP, pontina y reptina. Ambas se asocian con hTERT y diskarina por separado, reduciendo así la actividad catalítica de la enzima (Venteicher et al., 2008).

A. Mecanismo de acción de telomerasa en los telómeros.

El ciclo catalítico de la telomerasa consiste en una serie de etapas secuenciales, en las que una secuencia telomérica se añade al extremo 3' del ADN telomérico tras la unión de telomerasa al mismo. En la primera etapa, telomerasa reconoce y se une al sustrato, el extremo de la hebra 3' del ADN telomérico por complementariedad con su región molde.

El dominio CTE, en este caso, se encarga de estabilizar el híbrido ADN/ARN; entonces telomerasa transcribe los seis nucleótidos de su secuencia molde a través de la incorporación de nucleótidos de forma consecutiva al grupo hidroxilo (-OH) libre del extremo 3' de la hebra rica en guanina. En la tercera etapa, tras la adición de la primera repetición telomérica (TTAGGG), sufre una translocación y se realinea para la síntesis de la segunda repetición telomérica, o bien, se disocia del sustrato completamente (**Figura 1.14**) (Sfeir, 2012; Hukezalie y Wong, 2013).

Figura 1.14
Mecanismo de acción para la adición de repeticiones teloméricas en el extremo 3' de los telómeros mediado por telomerasa. Adaptado de (Sfeir, 2012).



El acceso de telomerasa al telómero se encuentra regulado de forma indirecta por las proteínas del complejo *shelterin*. Cuando el complejo TPP1-POT1 se encuentra unido al extremo sobresaliente de la hebra conductora, a través de POT1, evita el acceso de telomerasa al extremo de los cromosomas. Sin embargo, la proteína TPP1 posee cierta afinidad por telomerasa. Ésta, la atrae hacia el telómero, y el complejo es desplazado por mecanismos que aún no han sido identificados. De esta forma, telomerasa accede a su sustrato y comienza la elongación. Una vez que las nuevas repeticiones teloméricas son sintetizadas, se unen al complejo *shelterin*, y TPP1-POT1 se rehibrida en el extremo sobresaliente de la hebra 3', causando de nuevo la inhibición de telomerasa (Wang et al., 2007).

1.2.5.2 MECANISMOS ALTERNATIVOS DE MANTENIMIENTO TELOMÉRICO.

Algunas células tumorales que no presentan actividad telomerasa son capaces de mantener la longitud de sus telómeros. Esto indica la presencia de uno o más mecanismos alternativos de mantenimiento telomérico, que se conocen como mecanismos ALT (Bryan et al., 1995).

Las células que utilizan este tipo de mecanismos poseen unas características particulares que las diferencian de las células que utilizan telomerasa. Estas células ALT poseen una gran heterogeneidad en el tamaño de sus telómeros, incluso dentro de una misma célula, con longitudes que van desde límites indetectables hasta longitudes superiores a 20 kb (Murnane et al., 1994).

Otra característica común a este tipo de células, es la presencia de estructuras nucleares conocidas como APBs (*ALT-associated PML bodies*). Los APBs se diferencian de otros PNBs (*PML nuclear bodies*) por su contenido, ya que incluye ADN telomérico tanto lineal como circular, proteínas del complejo *shelterin*, y algunas proteínas implicadas en los procesos de recombinación y replicación del ADN, como RAD51, RAD52, RPA, el complejo MLL, BLM y WRN (Conomos et al., 2013).

El alargamiento de los telómeros en las células que utilizan estos mecanismos, se produce por un sistema basado en la recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*). Este sistema consiste en que la hebra simple del extremo

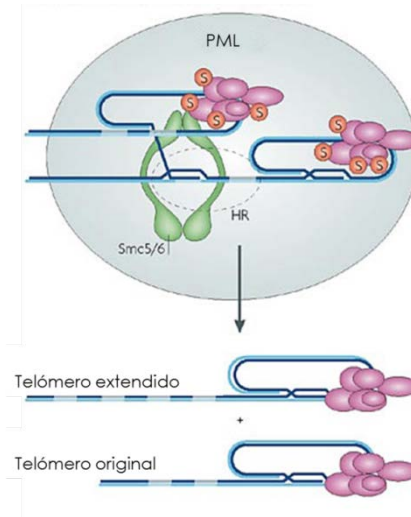


Figura 1.15
Mecanismo utilizado en las células ALT para el mantenimiento de la longitud telomérica, basado en la recombinación entre telómeros. Adaptado de (Murray and Carr, 2008).

3' de un telómero invade la doble hebra de ADN de otro telómero y lo usa como molde, resultando en un incremento de su longitud (Dunham et al., 2000). Este proceso tiene lugar en el interior de los APBs, en los que la sumolación de los componentes del complejo *shelterin* provoca el reclutamiento o mantenimiento de los telómeros en su interior, promoviendo la recombinación (**Figura 1.15**). El complejo Smc5/6 (*structural maintenance of chromosomes*) y las proteínas HR se asocian con estos cuerpos PML, en la fase G2 del ciclo celular, promoviendo también la recombinación homóloga entre los telómeros (Henson et al., 2002; Murray y Carr, 2008).

1.3

TELÓMEROS, TELOMERASA Y CÁNCER

Las células tumorales adquieren ciertas capacidades funcionales durante el desarrollo de un cáncer. Son estas características precisamente las que les confieren su particular capacidad de proliferación y diseminación a otros órganos, y las que las diferencian del resto de células del organismo. Las células cancerígenas presentan una señalización proliferativa sostenida, capacidad de evasión de los mecanismos de muerte celular y de factores supresores del crecimiento, inmortalidad replicativa, y capacidad de inducción de la angiogénesis, invasión y metástasis. Todas estas funciones son desarrolladas en distintos momentos a lo largo del proceso tumoral, pero su adquisición tiene como base fundamental la inestabilidad genómica (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011). La disfunción telomérica que se produce en las primeras etapas del proceso tumoral es considerada una de las principales fuentes de inestabilidad genómica implicadas en el desarrollo del cáncer (Lange, 1995).

Las células somáticas humanas poseen un potencial replicativo limitado, debido al progresivo acortamiento que sufre el ADN telomérico en cada ronda de replicación. Los telómeros son un fiel reflejo de la capacidad replicativa de las células ya que, como hemos visto anteriormente, tras la pérdida de los fragmentos teloméricos en cada ronda de replicación alcanzan una longitud crítica que provoca alteraciones en la morfología celular y la entrada de la célula en senescencia, un estado permanente de parada del crecimiento (Harley et al., 1990; Campisi, 1997). Por lo tanto, se puede decir que la senescencia replicativa es causada por un progresivo acortamiento telomérico, como se demostró tras la reintroducción de la subunidad catalítica de telomerasa en células en cultivo, en las que se produjo un aumento de su capacidad replicativa tras la adición de las repeticiones teloméricas por parte de telomerasa (Bodnar et al., 1998).

La función telomérica se ve debilitada cuando el ADN telomérico es acortado hasta una longitud considerada crítica, o bien, cuando las proteínas del complejo *shelterin* no son capaces de llevar a cabo su función, ya sea porque se encuentran alteradas, o bien, porque su expresión está disminuida. En ambos casos, los telómeros se consideran disfuncionales, y las consecuencias para la célula son similares.

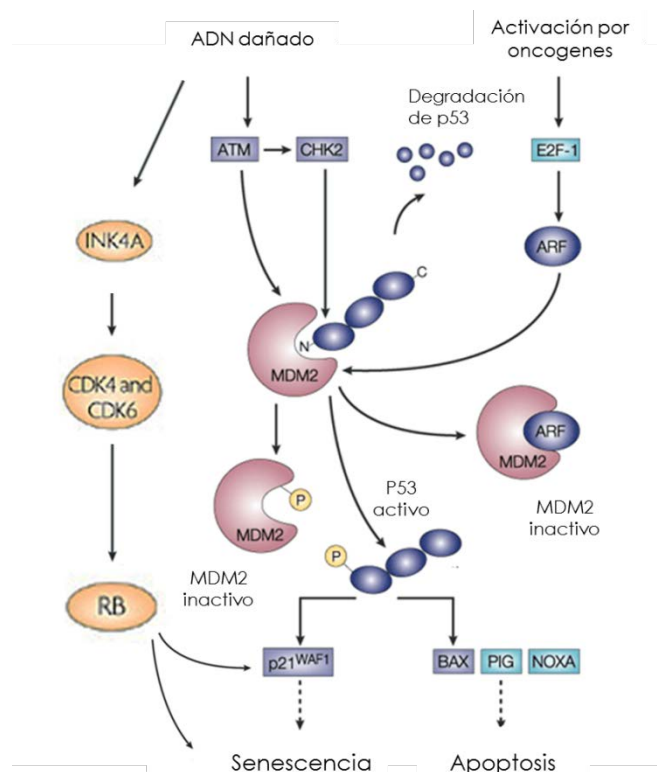


Figura 1.16
Puesta en marcha
de las rutas de
p53 y Rb en res-
puesta a la disfun-
ción telomérica.
Adaptado de
(Soussi and Bérour,
2001; Deng et al.,
2008).

Los telómeros disfuncionales son reconocidos como ADN dañado, de igual forma que las DSBs (*double-strand breaks*). El complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1) reconoce el ADN telomérico dañado y provoca la activación de las vías de señalización ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) y ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*). Una vez activadas, estas quinasas fosforilan a p53 directamente, o bien, a

través de los factores CHK1 y CHK2 (*checkpoint kinase 1 and 2*), que también promueven su fosforilación. Estas modificaciones favorecen el desplazamiento de MDM2 (*murine double minute 2*) de p53, lo que conduce a su estabilización en la forma activa, y a su actuación como activador transcripcional de diferentes vías (**Figura 1.16**) (Soussi y Bérout, 2001). Dependiendo del contexto celular en el que se encuentre, p53 es capaz de estimular la expresión de la proteína p21. Esta proteína se encarga de inhibir la actividad de Cdk2-cycE (*cyclin-dependent kinase 2 and cyclin E*), bloqueando la entrada en fase S del ciclo celular, y provocando la entrada en senescencia de la célula. Por otro lado, p21 también puede inducir la muerte celular por apoptosis mediante la activación de genes proapoptóticos como BAX (Artandi y Attardi, 2005).

Además de la vía p53/p21, la senescencia celular también es mediada por la vía p16INK4A/pRb. En respuesta a la disfunción telomérica, se produce la activación de p16INK4A que a su vez previene la fosforilación de retinoblastoma (Rb) por parte del complejo CDK4. Esto produce la parada del ciclo celular mediante la captación de E2F por hipofosforilación de Rb, contribuyendo a la entrada en senescencia de las células, especialmente en aquellas que pierden la funcionalidad de p53. Ambas vías, a su vez, se encuentran ligadas, ya que la inducción de p21 por parte de p53 puede provocar también la activación de Rb por inhibición de su fosforilación (Campisi, 2005; Jacobs y Lange, 2005). Cabría esperar, por tanto, que los telómeros disfuncionales se comportaran como inhibidores del progreso tumoral, sin embargo, en las células tumorales el efecto supresor del acortamiento telomérico desaparece. En los tumores, alteraciones en alguno de los componentes que forman parte de las vías reguladoras de la senescencia y la apoptosis, permiten a las células sufrir divisiones adicionales (Deng et al., 2008).

Estos telómeros disfuncionales son un sustrato potencial de los mecanismos HR (*homologous recombination*), lo que provoca la producción de fusiones entre los extremos de los cromosomas y fenómenos de recombinación que, en caso de un mantenimiento de la proliferación celular, pueden conducir a aberraciones cromosómicas e inestabilidad genómica (Mathon y Lloyd, 2001). Por lo tanto, la disfunción telomérica resulta en una inestabilidad cromosómica que, en ausencia de los procesos de senescencia y muerte normales de las células, favorece el desarrollo de un carcinoma (**Figura 1.17**) (Hande, 2004; Londoño-Vallejo, 2008).

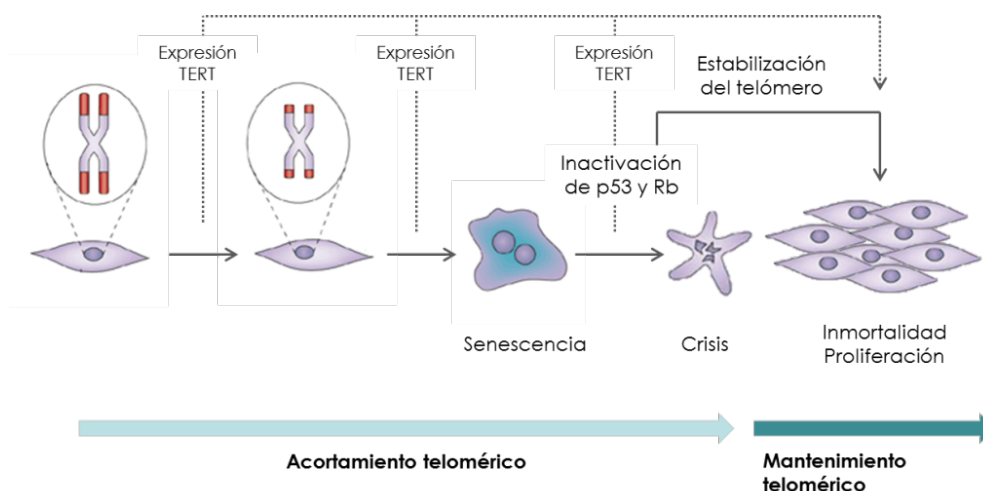


Figura 1.17
La longitud telomérica determina el potencial replicativo de las células.
Adaptado de (Mathon and Lloyd, 2001).

Además de la inestabilidad genómica provocada por los telómeros disfuncionales, la puesta en marcha de los mecanismos de mantenimiento telomérico también juega un papel crítico en la tumorigénesis (Shay y Wright, 2005; Deng y Chang, 2007). La progresión de las células en estas condiciones, requiere de la reactivación de la enzima telomerasa, o bien, de la puesta en marcha de los mecanismos ALT, con objeto de lograr una estabilización de la longitud telomérica. De esta forma, las células tumorales pueden progresar y adquirir un fenotipo inmortal (Stewart et al., 2000).

1.4

PROTEASAS EN CÁNCER GÁSTRICO

Una característica esencial de los tumores malignos es su capacidad para invadir los tejidos y generar metástasis. La progresión tumoral es un proceso secuencial en el cual se producen múltiples alteraciones en las células. Así, las células proliferan de forma activa y adquieren la capacidad de invasión de los tejidos adyacentes al tumor, a través de la pérdida de adhesiones célula-célula y célula-matriz extracelular, y de la degradación proteolítica de la misma. Esta nueva característica, junto con la formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos alrededor del tumor, conocida como angiogénesis, favorece la migración de las células tumorales hacia otros órganos, produciéndose así la metástasis del tumor (**Figura 1.18**) (Geiger y Peeper, 2009; Wirtz et al., 2011). En el caso del cáncer gástrico, la rápida progresión y metástasis de las células tumorales son las responsables del mal pronóstico que presentan la mayoría de los pacientes afectados.

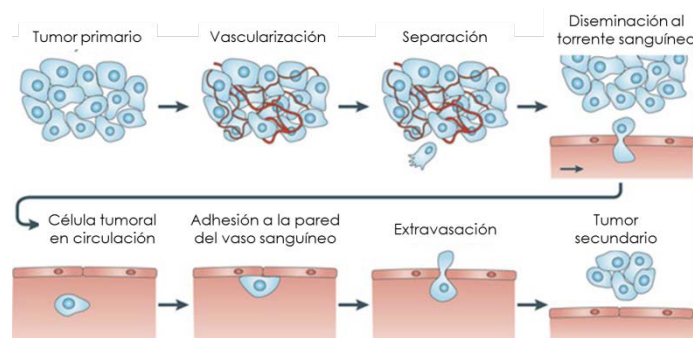


Figura 1.18
Esquema que
representa el
proceso secuencial de la metástasis de un tumor. Adaptado de (Wirtz et al., 2011).

Las proteasas están implicadas en una gran variedad de procesos biológicos y se asocian con multitud de enfermedades, entre ellas el cáncer. En este caso, desempeñan un papel fundamental durante la progresión neoplásica, ya que se encuentran implicadas en los procesos de degradación de las estructuras tisulares. Estas enzimas facilitan el acceso de las células tumorales a los sistemas de diseminación vascular y linfático, favoreciendo la diseminación del cáncer, gracias a su capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos.

Sin embargo, su papel en la progresión del cáncer es más complejo, ya que participan también en otras etapas del proceso tumoral, como la proliferación, adhesión, migración, angiogénesis, senescencia, apoptosis y evasión del sistema inmunológico (Lopez-Otin y Bond, 2008; Quesada et al., 2009).

El degradoma es el conjunto de genes codificantes para proteasas presentes en el genoma. En el caso de los humanos se han descrito 570 genes codificantes para proteasas que, a su vez, son clasificadas en cinco clases según su mecanismo de catálisis: serinproteasas, treoninproteasas, cisteínproteasas, aspartilproteasas y metaloproteasas. Así mismo, se pueden agrupar en familias, aun perteneciendo a distintas clases, de acuerdo con la secuencia aminoacídica que poseen. De forma análoga, se conoce como degradoma tumoral al conjunto de proteasas producidas por un tumor. Las familias más estudiadas por su implicación en cáncer son las metaloproteasas y las cisteínproteasas (Quesada et al., 2009).

1.4.1 FAMILIAS DE PROTEASAS IMPLICADAS EN CÁNCER GÁSTRICO.

1.4.1.1 METALOPROTEASAS.

Las metaloproteasas (MMPs, *matrix metalloproteinases*) son una familia de endopeptidasas neutras, dependientes de zinc, capaces de degradar los principales componentes de la matriz extracelular incluyendo colágeno, fibronectina, laminina y las glicoproteínas de la membrana basal. Las metaloproteasas no sólo son importantes en multitud de procesos biológicos y fisiológicos, como la embriogénesis, la remodelación de los tejidos, o la angiogénesis, sino también en enfermedades como la artritis o el cáncer (Egeblad y Werb, 2002).

Existen 23 miembros de la familia de las MMPs en humanos, y se clasifican dependiendo de su especificidad de sustrato, similitud de secuencia, y organización estructural en seis subfamilias: colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), estromelisininas (MMP-3, MMP10), matrilisininas (MMP-7, MMP-26), metaloproteasas tipo transmembrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-23, MMP-24, MMP-25) y otras MMPs (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-27, MMP-28). Todas difieren en su estructura y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz

de conducir a la degradación de casi todos los componentes de la matriz extracelular (Overall, 2002; Yadav et al., 2014).

Las MMPs poseen una estructura básica formada por un péptido señal, un pro-péptido, encargado de mantener a la enzima en estado latente hasta su eliminación por proteólisis, mediante la que se produce la activación de la enzima, y un dominio catalítico carboxi-terminal que se une a la molécula de zinc (**Figura 1.19**). Sobre esta estructura aparecen diversas variantes, como un dominio hemopexina (excepto en la MMP-7), que media la especificidad del sustrato y la interacción con inhibidores endógenos; y un dominio transmembrana en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática (MT-MMP, *membrane type MMP*) (Visse y Nagase, 2003).

Los niveles de expresión de las metaloproteasas se encuentran estrictamente regulados a nivel transcripcional, gracias a la acción de citoquinas, factores de crecimiento como IL-1 y TGF- β , por interacción con la matriz extracelular, por oncogenes liberados en el estroma, por las células infiltradas del sistema inmune, o por las propias células tumorales. En cuanto a la regulación de su actividad catalítica, ésta se produce de forma post-transcripcional por dos vías diferentes, mediante la regulación de su proceso de activación, o por inhibidores endógenos de su actividad enzimática. Las metaloproteasas son sintetizadas como zimógenos inactivos, y requieren de activación mediante una proteólisis. En casi todos los casos, la activación de las MMPs requiere de la participación de otras proteasas del tipo integrinas, las propias MT-MMP, o bien la acción de otras enzimas activadoras como convertasas de tipo furina (Yadav et al., 2014).

Como acabamos de comentar, la actividad catalítica de las metaloproteasas también es inhibida de forma endógena por unas proteínas relacionadas estructuralmente, conocidas como TIMPs (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*). Estos inhibidores se encuentran anclados en la membrana extracelular, o son secretados en el espacio extracelular, de modo que se unen a las MMPs de manera no covalente en forma de complejos estequiométricos 1:1, e inhiben su acción (Brew et al., 2000). Poseen un dominio N-terminal, que es el principal inhibidor, debido a su interacción con el dominio catalítico de la enzima, y un dominio C-terminal, formado por dos sitios de unión a la enzima. Se han descrito cuatro miembros de la familia de los inhibidores de metaloproteasas en humanos y, entre ellos, inhiben la actividad de todas las MMPs, pero no con la misma eficacia.

El inhibidor TIMP-1, preferentemente actúa sobre MMP-1, MMP-3, MMP-7 y MMP-9; TIMP-2 muestra preferencia por MMP-2; TIMP-3 inhibe a MMP-2 y MMP-9; y TIMP-4 disminuye la actividad de MMP-2 y MMP-14 (Nagase et al., 2006). Existen otras proteínas endógenas que también funcionan como inhibidores de las metaloproteasas, como RECK (*revisión-inducing-cystein-rich protein with kazal motifs*), TFPI2 (*tissue factor pathway-inhibitor-2*), PCPE (*procollagen C-proteinase enhancer*) o la macroglobulina $\alpha 2$ (Handsley y Edwards, 2005).

Los tumores malignos generan estrategias para evadir estos mecanismos de regulación de las metaloproteasas, lo que conduce a una actividad proteolítica incontrolada y, por tanto, a la generación de invasión y metástasis. El equilibrio entre la actividad proteolítica y la capacidad inhibitoria de los TIMPs, determinará el potencial proteolítico de los tumores. En algunos casos se ha determinado una relación entre la progresión tumoral, y un aumento de la expresión de los TIMPs (Lopez-Otin y Bond, 2008).

Existen varios mecanismos por los que las metaloproteasas contribuyen a la progresión tumoral. Algunos miembros de la familia de las metaloproteasas, como MMP-3 y MMP-7, liberan al medio precursores de factores de crecimiento como IGFs (*insulin-like growth factors*) y EGFR (*epidermal growth factor receptor*), promoviendo así la proliferación celular (Suzuki et al., 1997; Nakamura et al., 2005). Las metaloproteasas MMP-9, MMP-2 y MMP-14 contribuyen a este proceso activando proteolíticamente a la proforma inactiva de TGF- β , molécula muy implicada en el proceso tumorigénico (Yu y Stamenkovic, 2000).

Las metaloproteasas contribuyen al proceso angiogénico actuando como reguladores, tanto positivos como negativos dependiendo del momento en el que son expresados. Estas moléculas favorecen la angiogénesis incrementando la biodisponibilidad de factores como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y bFGF (*basic fibroblast growth factor*), o bien, impiden la formación de nuevos vasos a través de la generación de fragmentos de degradación que inhiben este proceso (O'Reilly et al., 1999; Foda y Zucker, 2001; Iozzo et al., 2009). Actúan también de forma dual en la apoptosis, y promueven la transición epitelio-mesénquima, proceso fundamental en la migración celular (Gialeli et al., 2011).

A. ADAMs.

Se ha descrito también una nueva familia de proteasas relacionadas estructuralmente con las MMPs, denominadas ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*). Esta familia está formada por metaloproteasas que tienen a mayores un dominio desintegrina. Son proteínas con una estructura muy compleja, que contiene un dominio propeptídico, un dominio metaloproteasa, un dominio tipo desintegrina, una zona rica en cisteína, un dominio tipo receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), una región transmembrana, y un dominio citoplasmático (**Figura 1.19**) (Blobel, 2002). Esta familia incluye, a su vez, un subgrupo de metaloproteasas con dominio desintegrina, que poseen además un dominio trombospondina I (ADAMTS, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) en su región C-terminal, pero carecen del dominio transmembrana presente en las ADAMs (Cal et al., 2002).

Son proteínas multifuncionales que se encuentran implicadas en varios procesos biológicos, como la fusión celular, la adhesión, la

migración, y el procesamiento proteolítico de otras proteínas transmembrana. Su nivel de actividad se encuentra regulado mediante regulación transcripcional, regulación por señalización celular a través de las vías MAPK y PKC, regulación de su actividad catalítica por otras metaloproteasas, y por la acción de inhibidores endógenos como los TIMPs, principalmente de TIMP-3, aunque aún no se conocen bien estos mecanismos (Mochizuki y Okada, 2007). Algunas de ellas, especialmente ADAM-10 y ADAM-17, participan en la promoción del crecimiento celular, la regulación de factores de crecimiento y la invasión celular, mediante la activación de la proforma de factores de crecimiento, receptores y proteínas de adhesión implicados en la patogénesis o la progresión del cáncer. Algunas ADAMs que son proteolíticamente inactivas, también pueden desempeñar un papel importante en la carcinogénesis (Duffy et al., 2011; Gialeli et al., 2011).

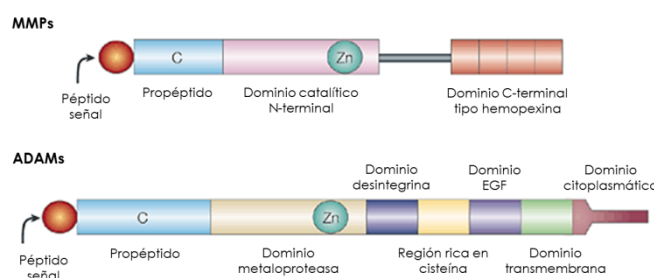


Figura 1.19
Diferencias estructurales entre las MMPs y las ADAMs. Adaptado de (Yong et al., 2001).

1.4.1.2 CISTEÍNPROTEASAS.

La familia de las cisteínpoteasas engloba a todas aquellas proteasas que presentan un residuo de cisteína en su centro catalítico. Estas moléculas están implicadas en importantes procesos biológicos como la apoptosis, el recambio de proteínas intracelulares, la activación de precursores hormonales, y la remodelación ósea. Además, juegan un importante papel en la invasión tumoral.

A. Catepsinas.

La familia de las catepsinas incluye a las catepsinas A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, O, S, V, W, X y Z. Todas están incluidas en la familia de las cisteínpoteasas, ya que conservan un sitio activo compuesto de residuos de cisteína, histidina, y asparagina, exceptuando a las catepsinas D y E que son dependientes de aspartato y, por tanto, pertenecen a las aspartilproteasas, y las catepsinas A y G que pertenecen a las serinproteasas (Tan et al., 2013).

En un principio, fueron consideradas como un grupo de hidrolasas intracelulares; sin embargo, posteriormente se ha descrito su participación en otros procesos biológicos. Por ejemplo, se les han atribuido funciones como mediadores en la respuesta inmune por MHC II, en la reproducción, o en el funcionamiento del corazón (Shi et al., 1999; Vasiljeva et al., 2007; Angelidis et al., 2013). Son expresadas en la superficie celular y secretadas al medio extracelular, donde ejercen su función. También son consideradas degradadores de la matriz extracelular. Son sintetizadas como precursores inactivos que son activados por autólisis en los lisosomas en el caso de las endopeptidasas, y por la propia acción de las endopeptidasas en el caso de las exopeptidasas (Turk et al., 2001).

Las catepsinas constituyen uno de los grupos de proteasas más estudiados en relación con el cáncer. Cada uno de sus miembros ejerce una función diferente durante todo el proceso tumoral y metastásico. Las catepsinas E, F, G y Z promueven la tumorigénesis, mientras que las catepsinas B, D, E, y X inducen la proliferación celular. Las catepsinas B, K, L y Z participan en la degradación de la matriz extracelular, concretamente, la catepsina X favorece la transición epitelio-mesénquima, y las catepsinas A, B y D inducen la diseminación de las células tumorales. Las catepsinas B, D, H, L, S y Z incrementan la movilidad de las células y su poder de invasión, favoreciendo la diseminación al torrente sanguíneo y a

los vasos linfáticos y, por tanto, facilitando las metástasis. Así, las catepsinas B, D, H y S promueven la proliferación celular, la angiogénesis y la formación de un tumor secundario. A su vez, algunas catepsinas pueden activar a otras proteasas, participando en la cascada proteolítica y favoreciendo la degradación de la matriz extracelular, o bien, inactivar proteínas de adhesión como E-cadherina (Nomura y Katunuma, 2005; Tan et al., 2013).

B. Caspasas.

Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de muerte celular programada y de los procesos de maduración de mediadores del sistema inmunitario, como las interleucinas. Participan en la proliferación, organización y migración de las células, e influyen en la secreción de varios factores de regulación (McIlwain et al., 2013).

Las caspasas poseen una compleja estructura formada por tres dominios, un predominio N-terminal, una subunidad grande que contiene el centro catalítico, y una subunidad pequeña en el extremo carboxi-terminal. Existen dos tipos de caspasas según su función, las caspasas efectoras que poseen un predominio corto, y las caspasas iniciadoras que poseen un predominio de mayor tamaño, que contiene dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD), o efectores de muerte celular (DED) (Nicholson y Thornberry, 1997).

La activación de las caspasas está relacionada con un cambio en su configuración estructural. Son sintetizadas como pro-caspasas, las cuales se agrupan y activan, bien por estímulos externos, o por auto-activación mediante la proteólisis en lugares de corte específicos, existentes entre los dominios. Estos dominios poseen un residuo de ácido aspártico, lo que provoca la eliminación del pre-dominio y la unión de las subunidades grande y pequeña, formando un complejo de dos heterodímeros y dos centros activos. Su acción es regulada e inhibida por potentes inhibidores endógenos, de los cuales, los más importantes son las proteínas pro-apoptóticas de la familia de BCL-2 (Nuñez et al., 1998; Parrish et al., 2013).

La alteración en los niveles de actividad de esta familia de proteasas es característica del cáncer, ya que las células tumorales se diferencian por presentar resistencia frente a la apoptosis. Algunas caspasas como CASP-3, CASP-6 y CASP-7, disminuyen su expresión

en las células tumorales, especialmente en estadios tempranos de la carcinogénesis (Yoo et al., 2004), mientras que otras caspasas iniciadoras, como la CASP-8, CASP-9 y CASP-10, muestran niveles de expresión mayores que en condiciones normales, en las que su expresión es prácticamente inexistente. En el caso particular del cáncer gástrico, las caspasas mediadoras de la inflamación CASP-1 y CASP-14 juegan un importante papel, ya que el proceso inflamatorio es crucial en el desarrollo de este tipo tumoral (Krajewska et al., 2005; Frejlich et al., 2013).

C. Proteínas *hedgehog*.

En humanos, se han identificado tres proteínas pertenecientes a la vía de señalización *Hedgehog*: SHH (*Sonic hedgehog*), IHH (*Indian hedgehog*) y DHH (*Desert hedgehog*). Esta familia de proteínas desempeña un papel fundamental en el desarrollo embrionario, regulando la formación de las extremidades, el esqueleto, los músculos, el tracto gastrointestinal y algunos órganos. En los organismos adultos, participan en el mantenimiento y regulación de las células madre, así como en la reparación y regeneración de los tejidos (Varjosalo y Taipale, 2008).

Son sintetizadas en forma de un precursor de 45 kilodaltons (kD), que requiere un proceso autocatalítico intramolecular que origina dos fragmentos peptídicos, el extremo C-terminal de 25 kD que carece de actividad biológica, y el extremo N-terminal de 19 kD que es el ligando activo. A

esta estructura se le añade una molécula de colesterol en su extremo C-terminal, y una de ácido palmítico en su extremo N-terminal (Goetz et al., 2006). La activación de esta vía de señalización se

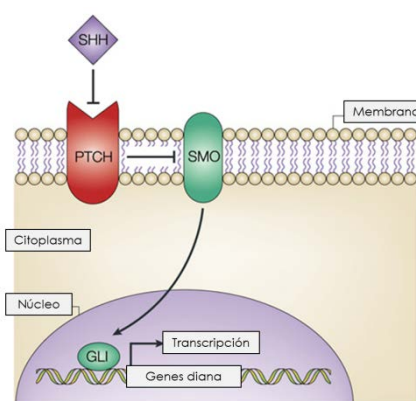


Figura 1.20
Activación de la
vía de señaliza-
ción Hedgehog.
Adaptado de
(Owens and
Watt, 2003)

produce por la unión de los ligandos a un receptor PTCH (*patched*), que actúa como regulador negativo de la proteína SMO (*smoothened*) (Figura 1.20) (Owens y Watt, 2003). La unión entre las proteínas *hedgehog* y el receptor PTCH provoca una disminución en la represión sobre SMO y da lugar al inicio de la cascada de señalización intracelular a través

de la translocación de la forma activa del factor de transcripción GLI (*glioma-associated oncogene homolog*) al núcleo, que inicia la transcripción de los genes diana implicados en la proliferación celular y en el desarrollo y mantenimiento tisular (Varjosalo y Taipale, 2008).

Esta vía tiene una implicación especial en la carcinogénesis gástrica, ya que es responsable de los procesos de diferenciación de las células epiteliales gástricas y, por tanto, una alteración en sus niveles de actividad provocaría una proliferación incontrolada de las células de la mucosa gástrica (Katoh y Katoh, 2005; Kang et al., 2009; Feng et al., 2012). SHH participa también en la regulación de la secreción de ácido en el estómago, por lo que la pérdida de actividad de esta vía puede provocar hipergastrinemia, lo que también favorece la carcinogénesis gástrica (Xiao et al., 2010).

Es interesante mencionar también la relación existente entre las proteínas *hedgehog* y la infección por *Helicobacter pylori* que, como ya se ha mencionado anteriormente, provoca una inflamación crónica de la mucosa gástrica y está directamente asociada con el desarrollo del cáncer gástrico. La pérdida de secreción de ácido por parte de las células parietales, en los casos de atrofia producida por esta bacteria, conlleva a la disminución de la secreción de numerosos factores como TGF- β , FGFs y las proteínas *hedgehog*, favoreciendo la inflamación y la progresión del cáncer (Katoh y Katoh, 2006). Además, la disminución de la secreción de SHH está asociada con el aumento en la expresión de factores como CDX2 (*caudal-type homeobox transcription factor 2*), lo cual promueve la metaplasia intestinal en el estómago (Dimmler et al., 2003). Por otro lado, esta pérdida de expresión de SHH, relacionada con las lesiones previas al desarrollo del carcinoma gástrico, se contradice con un incremento en la producción de SHH durante la tumorigénesis. Este hecho ha sido detectado en algunos estudios, indicando que también juega un importante papel en el crecimiento tumoral y en la progresión hacia estadios más avanzados, posiblemente a través de factores como BCL-2 o NF- κ B (Ma et al., 2005; Kasperczyk et al., 2009; Martin et al., 2010).

Objetivos

2

2.1 OBJETIVOS

El cáncer es un conjunto de enfermedades de características extraordinariamente diversas. Cada tipo tumoral es único, y cada paciente, a su vez, es único. La complejidad del cáncer se ve reflejada en el hecho de que se ha convertido en uno de los problemas más omnipresentes en la sociedad. Las células poseen un riesgo potencial inherente de mutación en nuestra composición genética y fisiológica, pero a su vez, muestran una compleja red de mecanismos de defensa frente a la tumorigénesis; por lo que el desarrollo tumoral solo es posible cuando estos sistemas se alteran. La presencia de programas limitadores de la progresión celular, los sistemas de reparación de errores, y los mecanismos de supresión tumoral, confieren una protección natural frente al cáncer; pero también pueden considerarse los mecanismos biológicos que subyacen a él. Una evolución en nuestro entendimiento de la biología del cáncer, y una apreciación mucho más cabal de los múltiples factores que contribuyen a causarlo, nos pueden proporcionar la ayuda necesaria para combatirlo.

Dentro del grupo de los tumores gastrointestinales, el cáncer colorrectal es el tipo tumoral que muestra una mayor incidencia en la población. Sin embargo, su índice de mortalidad ha disminuido en los últimos años gracias a los amplios conocimientos adquiridos a nivel molecular, lo cual ha contribuido al diseño de protocolos de diagnóstico y tratamiento más eficaces. El cáncer gástrico, aunque menos frecuente, es el tumor gastrointestinal más agresivo, y el causante de mayor número de muertes al año, a nivel mundial (Ferlay et al., 2014). Sin embargo, los estudios destinados al conocimiento del desarrollo del cáncer gástrico son escasos.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación, en cáncer colorrectal y en cáncer no microcítico de pulmón, ponen de manifiesto la relevancia de la función telomérica en el pronóstico clínico de los pacientes (García-Aranda et al., 2006), (Frías et al., 2008).

Estos estudios nos conducen a plantear una investigación en cánceres gástricos, con y sin inestabilidad en microsatélites. Los objetivos fundamentales del presente estudio son:

1. Determinar las características clínico-patológicas y el impacto sobre el pronóstico clínico de los tumores gástricos con inestabilidad en microsatélites.
2. Analizar la relevancia de la función telomérica en el cáncer gástrico.
 - 2.1. Estudiar la longitud de los telómeros, la actividad telomerasa y la expresión de factores relacionados con la estabilidad de las secuencias teloméricas, en muestras tumorales y no tumorales de pacientes afectados de cáncer gástrico.
 - 2.2. Evaluar el impacto sobre el pronóstico clínico de los determinantes moleculares indicados en el objetivo 2.1.
 - 2.3. Establecer la relevancia de la función telomérica en los cánceres gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites.
3. Investigar el Degradoma Tumoral en cáncer gástrico.

Material
y métodos

3

3.1

PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES

Este trabajo ha sido realizado empleando muestras tisulares procedentes del Biobanco del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, pertenecientes a 85 pacientes afectados de cáncer gástrico; los cuales, fueron sometidos a cirugía de carácter curativo en el Servicio de Cirugía del nombrado hospital. Previamente, se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los pacientes para el uso completo de dichas muestras. Para confirmar su contenido en células tumorales, las muestras fueron analizadas por el Servicio de Anatomía Patológica del mismo Hospital, siendo aptas para el estudio solamente aquellas que presentaron un porcentaje de tejido tumoral superior al 80%, y menos de un 20% de tejido necrosado. Para ello, se realizaron cortes de 5 μm de grosor del propio bloque de tejido, mantenido a -80°C , y embebido en medio congelante (*Jung Tissue Freezing Medium*TM (Leyca Microsystems, Alemania)), mediante el uso de un criostato en el propio Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Los cortes fueron trasladados al Hospital para su tinción con hematoxilina-eosina, y su posterior análisis microscópico. De todos los pacientes se dispuso también de una muestra de tejido no tumoral, tomada al menos a 10 cm de la zona del tumor, las cuales fueron usadas como control en las diferentes pruebas del estudio.

Con el fin de establecer correlaciones entre las determinaciones moleculares realizadas en las muestras objeto de estudio y sus características clínico-patológicas, fue proporcionada por el propio hospital toda la información referente a cada paciente, junto con su seguimiento clínico; así como las características propias de cada tumor. Las pautas a seguir para la estadificación de dicha población, se obtuvieron de la Guía de Prácticas en Oncología versión 2.2010 para cáncer gástrico de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC) 7th ed.* (Washington, 2010). En ella, se establecen los criterios para la aplicación del sistema TNM (*Tumour, Node and Metastasis*) en este tipo tumoral, y de esta forma,

definir los distintos estadios de la enfermedad bajo un criterio global. El sistema TNM de clasificación (**Tabla 3.1**) considera tres parámetros clave de información:

- T: describe la extensión del tumor primario (crecimiento hacia el interior de la pared del estómago y órganos cercanos).
- N: describe la propagación a los ganglios linfáticos adyacentes al tumor.
- M: indica la presencia o no de diseminación a regiones distantes del organismo.

Tabla 3.1
Características de los descriptores T, N y M establecidos para cáncer gástrico por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) 7th ed. (2010).

TUMOR PRIMARIO (T)	TX	No se puede evaluar el tumor principal.
	T0	No se encuentran evidencias de un tumor principal.
	Tis	Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lamina propia.
	T1	El tumor invade desde la capa superior de la mucosa hacia las capas inferiores.
	T1a	El tumor está creciendo hacia la lámina propia o la mucosa muscularis.
	T1b	El tumor crece a través de la lámina propia y la mucosa muscularis hacia la submucosa.
	T2	El tumor crece hacia la capa muscularis propia.
	T3	El tumor crece hacia la capa subserosa.
	T4	El tumor ha crecido hacia la serosa y puede estar creciendo hacia un órgano adyacente.
	T4a	El tumor crece hacia la serosa, pero no invade ningún órgano o estructura adyacente.
	T4b	El tumor invade órganos o estructuras adyacentes.
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos adyacentes
	N0	No hay propagación a los ganglios linfáticos adyacentes.
	N1	Metástasis en 1 - 2 ganglios linfáticos adyacentes.
	N2	Metástasis en 3 - 6 ganglios linfáticos adyacentes.
	N3	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos adyacentes.
METÁSTASIS (M)	N3a	Metástasis en 7 - 15 ganglios linfáticos adyacentes.
	N3b	Metástasis en 16 o más ganglios linfáticos adyacentes.
	M0	No hay metástasis a distancia (el cáncer no se ha propagado a órganos o sitios distantes, tales como el hígado, los pulmones o el cerebro)
	M1	Hay metástasis distantes (el cáncer se propagó a órganos o ganglios linfáticos distantes del estómago).

Una vez establecidos estos criterios para cada uno de los pacientes, fue posible definir el estadio de la enfermedad en cada uno de los casos (**Tabla 3.2**).

ESTADIO TUMORAL	ESTADIO I	IA	T1, N0, M0
		IB	T1, N1, M0
			T2, N0, M0
	ESTADIO II	IIA	T1, N2, M0
			T2, N1, M0
			T3, N0, M0
		IIB	T1, N3, M0
			T2, N2, M0
			T3, N1, M0
	ESTADIO III	IIIA	T4a, N0, M0
			T2, N3, M0
			T3, N2, M0
		IIIB	T4a, N1, M0
			T3, N3, M0
			T4a, N2, M0
	ESTADIO IV	IIIC	T4b, N0 ó N1, M0
			T4a, N3, M0
	ESTADIO IV	IV	T4b, N2 ó N3, M0
			T, N, M1

Tabla 3.2
Clasificación TNM
para carcinomas
de estómago
establecida por la
American Joint
Committee on
Cancer (AJCC) 7th
ed. (2010).

Respecto a la histología del tumor, se empleó como guía la clasificación definida por Lauren en 1965 (Lauren, 1965) que, como ya hemos comentado, subdivide la población de tumores gástricos en dos tipos histológicos principales: el tipo difuso, y el tipo intestinal. Cada uno de ellos con características histopatológicas, clínicas, y epidemiológicas propias. En el caso de que un tumor fuera inclasificable en alguno de los dos grupos anteriores, se consideró como un tumor gástrico de tipo mixto y no se tuvo en cuenta para las pruebas estadísticas.

Por último, también se utilizó la localización anatómica de los tumores gástricos para la descripción de la población tumoral, diferenciándola en distal, media y proximal. Los carcinomas gástricos situados en el tercio superior del estómago fueron considerados de localización proximal, mientras que los situados en el tercio inferior fueron considerados de localización distal. Aunque en un primer momento se distinguieron estas tres localizaciones, a nivel estadístico se consideraron los carcinomas de localización distal y media, como un grupo único.

La media de edad de los pacientes fue de 70.51 ± 1.36 años (media \pm error típico), con un intervalo de edad desde 37 a 93 años. El percentil 50 correspondiente a la edad de los pacientes fue de 73 años, dato que fue usado como variable para los estudios estadísticos. De los 85 pacientes que formaron parte del estudio, 47 (55.3%) fueron hombres y 38 (44.7%) fueron mujeres. La distribución de la población, según las características clínico-patológicas de la misma, está resumida en la **Tabla 3.3**.

		Nº casos	(%)	Total
SEXO	Varón	47	(55.3)	85
	Mujer	38	(44.7)	
EDAD	≤ 73 años	44	(52.4)	84*
	> 73 años	40	(47.6)	
TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	27	(36.5)	74*
	Intestinal	46	(62.2)	
	Mixto	1	(1.4)	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	Distal	45	(59.2)	76*
	Medio	18	(23.7)	
	Proximal	13	(17.1)	
TUMOR PRIMARIO (T)	T1	7	(8.8)	80*
	T2	21	(26.3)	
	T3	33	(41.3)	
	T4	19	(23.8)	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	31	(38.8)	80*
	N1	15	(18.8)	
	N2	13	(16.3)	
	N3	21	(26.3)	
METÁSTASIS (M)	M0	72	(90.0)	80*
	M1	8	(10.0)	
ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	18	(22.5)	80*
	IIa, IIb	22	(27.5)	
	IIIa, IIIb, IIIc	32	(40.0)	
	IV	8	(10.0)	

* No se obtuvieron los datos completos de todos los pacientes.

Tabla 3.3
Descripción de la población de tumores gástricos respecto a las variables clínico-patológicas.

3.2 INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES

3.2.1 AISLAMIENTO DE ADN.

A. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de los tejidos se empleó el método de Blin y Stafford (Blin y Stafford, 1976) con modificaciones. Se partió de 25 cortes de tejido de 20 μm a los que se añadió 1.25 ml de la solución tampón 1 ($\text{pH} = 7.5$) (Tabla 3.4), previamente pulverizados con ayuda de una espátula estéril fría. Se llevó a cabo una homogeneización del tejido, y se añadieron 25 μl de una solución de 20 mg/ml de proteinasa K (Sigma-Aldrich, EE.UU.) para la degradación de las proteínas presentes en el tejido. A continuación, se añadieron 62.5 μl de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) al 20% (p/v), y se mezcló por inversión. La muestra se sometió a digestión (65°C , 3 horas) en un baño térmico. Finalizada la digestión, se añadieron 1.25 ml de la solución tampón 2 ($\text{pH} = 7.5$) (Tabla 3.4), y 2.5 ml de una solución comercial de fenol ($\text{pH} = 8.0$) (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Se mezcló bien todo el contenido de los tubos con un agitador mecánico, y se centrifugaron (4000 rpm, T° ambiente, 15 min).

	Solución tampón 1	Solución tampón 2
Tris-HCl	10 mM	10 mM
EDTA	10 mM	10 mM
NaCl	0.15 M	0.65 M

Tabla 3.4
Composición de las soluciones tampón utilizadas para la extracción de ADN.

La fase acuosa obtenida, que contiene el ADN, fue transferida a un tubo estéril. Se realizó la extracción de nuevo del ADN con un volumen de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se recogió la fase acuosa, y se procedió a su precipitación con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugaron los tubos que contenían el ADN (4000 rpm, 4°C, 15 min), y se lavó el precipitado resultante con 1 ml de etanol frío al 70% (v/v). Se centrifugaron de nuevo, y se dejó secar el precipitado, para diluirlo a continuación en 100 µl de agua ultrapura estéril (AUE), y ser almacenado a -20°C.

B. Valoración de la concentración y pureza del ADN extraído.

La cuantificación y la valoración de la pureza del ADN se realizaron mediante una lectura espectrofotométrica doble a 260 y 280 nm. Dichas longitudes de onda corresponden a los niveles máximos de absorbancia de los ácidos nucleicos, y de los aminoácidos de las proteínas, respectivamente. Por lo tanto, el cociente de los valores obtenidos (A_{260}/A_{280}) con esta medición, proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos, y en condiciones óptimas debe situarse entre 1.8 - 2; siendo descartadas las extracciones que no cumplieran este requisito. Así mismo, la absorbancia a 260 nm fue utilizada para la cuantificación del ADN, teniendo en cuenta que cada unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena (Sambrook et al., 1988).

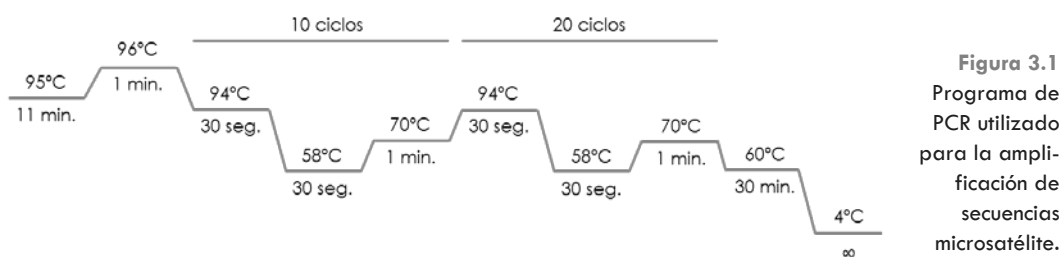
C. Valoración de la integridad del ADN extraído.

La integridad del ADN extraído fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad, EE.UU.) al 0.8% (p/v), de 1 µg de ADN de cada muestra extraída. A cada una de ellas se le añadió un tampón de carga compuesto por glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v) y xilano cianol 0.25% (p/v). Como tampón de electroforesis se utilizó TBE 1X (TBE 10X: Tris 0.89 M, ácido bórico 0.88 M, EDTA 0.01 M). Para su visualización, se añadió bromuro de etidio (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, EE.UU.), un agente fluorescente que se intercala en los ácidos nucleicos y los hace visibles a la luz ultravioleta.

3.2.2 ESTUDIO DE INESTABILIDAD EN SECUENCIAS MICROSATÉLITE.

El análisis para determinar la presencia de inestabilidad en secuencias microsatélite se realizó mediante la comparación del perfil alélico generado tras la amplificación de una serie de secuencias microsatélite, entre la muestra no tumoral y la muestra tumoral del mismo paciente.

El sistema empleado fue el *MSI Analysis System, Version 1.2* (Promega, EE.UU.) que incluye el análisis de cinco marcadores, seleccionados por su alta especificidad en tumores, que presentan defectos en las vías de reparación del ADN. Se procedió entonces a la co-amplificación mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de dos repeticiones mononucleotídicas (*BAT-25* y *BAT-26*), y tres repeticiones dinucleotídicas (*NR-21*, *NR-24* y *MONO-27*), a partir de 20 ng de ADN de cada una de las muestras, según el programa mostrado en la **Figura 3.1**.

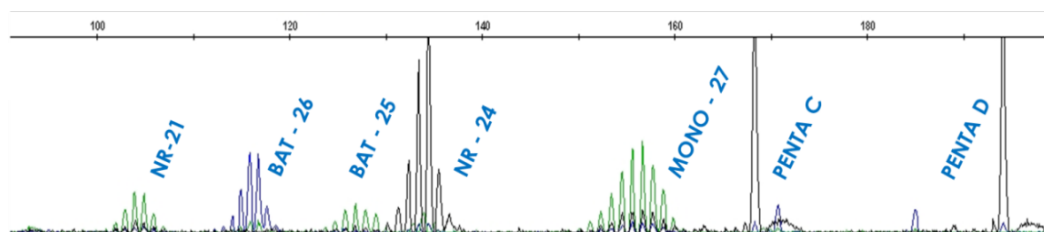


Además de los cinco marcadores mencionados, se amplificaron también dos secuencias pentanucleotídicas (*Penta C* y *Penta D*), con el fin de discernir posibles mezclas o contaminaciones de las muestras. Estas secuencias se escogieron dada su alta tasa de polimorfismos y su baja tendencia a presentar inestabilidad. El tamaño de los productos específicos de PCR y las sondas de fluorescencia usadas para cada uno de ellos se describen en la **Tabla 3.5**.

	Número del Gen Bank®	Secuencia mayoritaria	Tamaño del amplificado (pb)	Sonda	
NR-21	XM_033393	(A) ₂₁	94-101	JOE	Tabla 3.5 Características principales de las secuencias de microsatélite analizadas.
BAT-26	U41210	(A) ₂₆	103-105	FL	
BAT-25	L04143	(A) ₂₅	114-124	JOE	
NR-24	X60152	(A) ₂₄	130-133	TMR	
MONO-27	AC007684	(A) ₂₇	142-154	JOE	
Penta C	AL138752	(AAAAG) ₃₋₁₅	143-194	TMR	
Penta D	AC000014	(AAAAG) ₂₋₁₇	135-201	FL	

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis capilar tras la adición de un estándar interno, utilizado para la identificación de los fragmentos obtenidos (*GeneScan™ - 500 LIZ™ Size Standard* (Life Technologies, EE.UU.)); y tras su dilución en formamida (**Figura 3.2**). El análisis de los amplificados se realizó con el *ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer* por medio del programa informático *GeneMapper® 4.0* (Life Technologies, EE.UU.).

Figura 3.2
Electroforesis capilar de los productos de PCR obtenidos con el MSI Analysis System, Version 1.2.



Aquellas muestras que presentaron alteraciones en el perfil alélico en dos o más de estos marcadores, se consideraron de alta inestabilidad en microsatélites (*Microsatellite instability-high* o MSI-H); mientras que aquellas con un sólo marcador alterado, se consideraron de baja inestabilidad en microsatélites (*Microsatellite instability-low* o MSI-L). Las muestras que no presentaron ninguna alteración en los marcadores, fueron clasificadas como estables (*Microsatellite stable* o MSS).

3.3 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

3.3.1 ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA POR ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN TERMINAL.

El método estándar y el más utilizado para evaluar la longitud de los telómeros es el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRF) (Lange et al., 1990). Este método consiste en el análisis de los fragmentos teloméricos obtenidos tras la digestión diferencial del ADN genómico de una muestra con enzimas de restricción de corte frecuente, que digieren el ADN no telomérico en fragmentos de bajo peso molecular y dejan intacto el ADN telomérico y subtelomérico.

Este ensayo fue llevado a cabo utilizando el *TeloTTAGGG Telomere Length Assay kit* (Roche, Alemania) y consistió en la digestión de 5 µg de ADN genómico de la muestra no tumoral y tumoral de cada paciente con las enzimas de restricción de corte frecuente *Hinf I* y *Rsa I* (37°C, 2 h). Tras la digestión, los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) en TAE 1X (TAE 10X: Tris 2 M, EDTA 50 mM, ácido acético glacial, pH = 8.0) y, a continuación, transferidos a una membrana de nailon cargada positivamente en tampón de transferencia SSC 20X (NaCl 3M, citrato sódico 0.3 M, pH = 7.0) durante toda la noche.

Una vez transferidos dichos fragmentos, se procedió a su fijación a la membrana con luz UV (254 nm, 7 min) y calor (80°C, 30 min) y a su posterior hibridación con un oligonucleótido marcado con digoxigenina, complementario a las repeticiones teloméricas TTAGGG. Tras este paso, se incubó la membrana con un anticuerpo específico para digoxigenina, el cual se encontraba a su vez unido covalentemente a fosfatasa alcalina. Esta enzima metaboliza el sustrato quimio-luminiscente de alta sensibilidad *CDP-Star*, y genera una señal que permite la visualización de los fragmentos tras su revelado con una película autorradiográfica (*Amersham HyperfilmTM MP* (GE Healthcare, UK)).

La longitud de los fragmentos de restricción terminal de cada muestra se determinó por densitometría de la señal obtenida, en función del tamaño del fragmento, con respecto a un marcador de peso molecular. Debido a la heterogeneidad de los telómeros de los distintos cromosomas de todas las células presentes en un mismo tejido, se obtuvo un *smear* y no una única banda; por lo tanto, lo que se obtiene es una media de las longitudes de todos los fragmentos teloméricos generados dentro de una misma muestra. El análisis se realizó con el programa informático *ImageGauge 3.46* (FujiFilm, Japón).

3.3.2 ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.

Hasta hace pocos años se presuponía imposible la medida de la longitud telomérica mediante una reacción de amplificación, debido a la naturaleza repetitiva de su secuencia. Esta característica del ADN telomérico favorecería la formación de dímeros por parte de los cebadores complementarios a la secuencia telomérica, hasta que Richard M. Cawthon publicó un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Q-PCR) para la determinación de la longitud telomérica (Cawthon, 2002). Esta técnica es comúnmente utilizada para cuantificar de forma relativa el número de copias de un gen diana, con respecto a una muestra de referencia. Se trata de una variante de la PCR convencional, que nos permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos por cada ciclo de amplificación (a tiempo real). Para ello, se utiliza una molécula fluorescente que se une específicamente a la secuencia objeto de estudio, y que ayuda a monitorizar los fragmentos de amplificación que son producidos de forma exponencial en cada ciclo de reacción de la PCR, combinando así la amplificación y la detección en un solo ensayo.

En el caso de la determinación de la longitud telomérica, lo que se lleva a cabo es una cuantificación relativa de la misma, mediante la determinación del ratio (T/S) de cada muestra. Este ratio viene dado por el número de copias de su secuencia telomérica (T) entre el número de copias de un gen de copia única (S), obtenidos tras la reacción de amplificación y con respecto a un ADN de referencia. Este factor

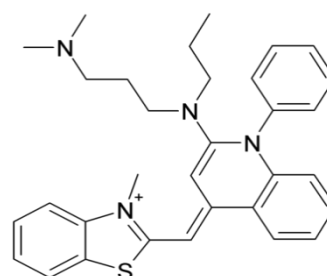


Figura 3.3
Molécula de
SYBR Green®.

será proporcional a la cantidad de repeticiones de ADN telomérico presente en la muestra inicial y, por tanto, a su longitud telomérica. Se amplifica a su vez un gen de copia única, en las mismas condiciones que para la secuencia telomérica, que funcionará como control del número de ciclos de amplificación. En nuestro caso se utilizó el gen *RPLP0* (*ribosomal protein large P0*) que codifica para la proteína P0 que forma parte de la subunidad 60S del ribosoma.

Para la detección de los fragmentos de amplificación se utilizó *SYBR Green*[®] (Roche, Alemania) (**Figura 3.3**). Se trata de un compuesto orgánico que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN, y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, produciendo un aumento de su fluorescencia (**Figura 3.4**). Este tipo de fluorocromo no es específico, ya que se une a toda molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de *primers*.

Se realizaron, por tanto, dos reacciones de amplificación por muestra. Cada una de ellas contenía 20 ng de ADN, a los que se añadieron 5 µl de la mezcla de reacción *FastStar Universal SYBR Green Master (ROX) 2X* (ROCHE, Alemania), y los *primers* correspondientes para cada secuencia, en 10 µl de volumen final. En el caso de la reacción de amplificación de la secuencia telomérica, se emplearon 900 nM del *primer forward* y 300 nM del *primer reverse*; mientras que para la amplificación del gen *RPLP0* se emplearon 500 nM del *primer forward* y 300 nM del *primer reverse*. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla 3.6**.

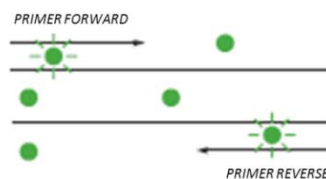
1. Reacción: Las moléculas de *SYBR Green*[®] se unen al ADN de doble cadena.



2. Desnaturalización: Cuando el ADN se desnaturaliza, el *SYBR Green*[®] se libera y el nivel de fluorescencia disminuye.



3. Polimerización: Durante la fase de extensión, los *primers* se hibridan y se genera el producto de PCR.



4. Polimerización completa: Las moléculas de *SYBR Green*[®] se unen al ADN producto generando un incremento en la fluorescencia.

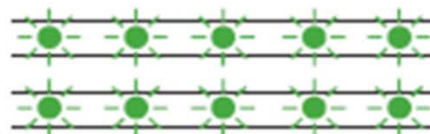


Figura 3.4
Esquema de la emisión de fluorescencia por moléculas de *SYBR Green*[®] durante una reacción de amplificación por Q-PCR.

Tabla 3.6
Secuencia de los primers utilizados para la medida de la longitud de los telómeros por PCR cuantitativa a tiempo real. (TEL: secuencia telomérica, F: Primer forward, R: Primer reverse).

	Secuencia primers
	F: 5'-CGGTTTGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT-3'
	R: 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'
	F: 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
	R: 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Como ADN de referencia se empleó el mismo ADN control que en el análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF), y fue tratado con las mismas condiciones que las muestras experimentales. Todas las muestras se analizaron por triplicado en un *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, EE.UU.), en el que fueron sometidas al programa de amplificación indicado en la **Figura 3.5**.

Durante el tiempo que transcurre la amplificación, el aparato es capaz de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longi-

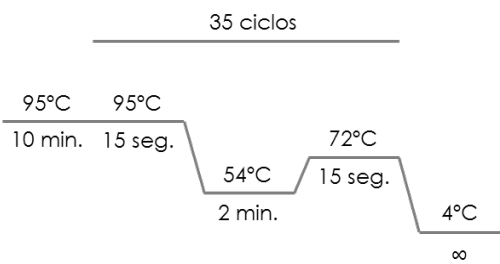


Figura 3.5
Programa de Q-PCR para la amplificación de secuencias teloméricas.

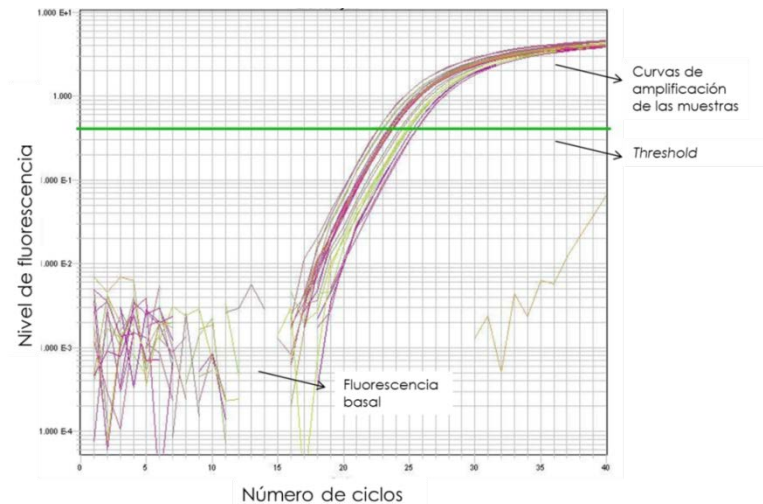
tud de onda determinada, y detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado, en un ciclo determinado de la PCR. Este valor es conocido como ciclo umbral (Ct), y se designa como el número de ciclo en el cual, se detecta un cambio significativo en el nivel de fluorescencia emitido por la muestra; su cálculo siempre se realiza en la fase exponencial de la curva de amplificación (**Figura 3.6**).

Dicho valor de ciclo umbral fue el utilizado para realizar el análisis de resultados de esta técnica, que fue llevado a cabo, siguiendo el método definido por Pfaffl (Pfaffl, 2001). Este método tiene en cuenta la eficiencia de cada pareja de primers utilizada. La eficiencia es muy importante en este tipo de ensayos, y se define como la medida de la cantidad de secuencia del gen diana que es amplificada en cada ciclo de reacción. Una eficiencia de reacción del 100% equivale a la amplificación de doble cantidad de secuencia diana en cada ciclo de PCR.

Para calcular la eficiencia en nuestro ensayo, se realizó una curva estándar por cada experimento realizado, tanto para la secuencia telomérica como para el control endógeno, a partir de diluciones 1/10 de una solución de ADN extraído de células HeLa², las cuales fueron tratadas igual que el resto de muestras del experimento.

Figura 3.6

Gráfica de amplificación de PCR a tiempo real. El *threshold* determina el umbral en el que se produce un cambio significativo en el nivel de fluorescencia. El corte entre este umbral y la curva de amplificación determinará el Ct (ciclo umbral) empleado para la cuantificación.



La eficiencia de cada pareja de *primers* fue calculada mediante la representación de una gráfica, en la que se compararon los valores de Ct obtenidos para cada dilución de la curva patrón, respecto al logaritmo en base 10 de la cantidad de ADN analizado (**Figura 3.7**). De esta manera, se obtuvo la ecuación de la recta patrón, a partir de la cual se calculó la pendiente de la misma.

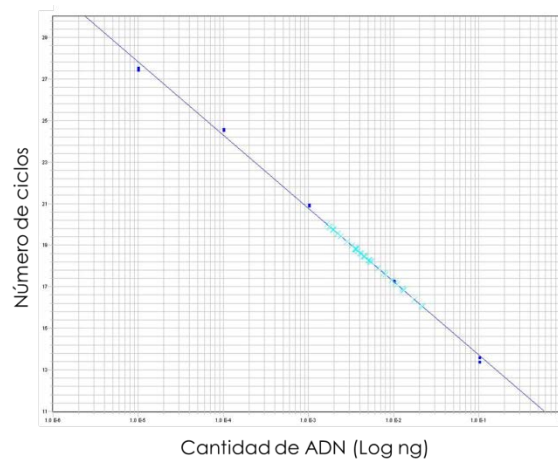


Figura 3.7
Curva patrón utilizada para calcular la eficiencia del experimento.

² Las células HeLa (también conocidas como "células MePa" o simplemente "Hela") son un tipo celular derivado de una muestra de cáncer cérvico-uterino, procedente de una paciente llamada Henrietta Lacks. Obtenidas el 8 de febrero de 1951, son el linaje celular humano más antiguo, y utilizado con mayor frecuencia (Masters, 2002).

Tras la determinación de la pendiente de la curva patrón, se calculó la eficiencia de amplificación de cada pajea de *primers* siguiendo la siguiente fórmula. Este cálculo se repitió para cada uno de los experimentos que se llevaron a cabo, y se consideraron adecuados solamente aquellos cuya eficiencia de amplificación se situó entre el 90 - 110%.

$$E = [10^{(-1/\text{pendiente})}]$$

Una vez realizado esto, se procedió al cálculo de la longitud telomérica relativa de cada muestra, respecto al ADN usado como referencia aplicando la siguiente fórmula, tal como se describe en (Pfaffl, 2001), teniendo en cuenta las eficiencias calculadas, previamente, en cada experimento.

$$\text{ratio T/S} = \frac{E_{\text{TEL}} \wedge (Ct_{\text{ADN referencia}} - Ct_{\text{muestra}})}{E_{\text{RPLP0}} \wedge (Ct_{\text{ADN referencia}} - Ct_{\text{muestra}})}$$

3.4

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA

3.4.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTÉICOS.

A. Extracción de proteínas.

Se partió de 20 cortes de tejido de 20 μm de grosor, incluidos en un tubo estéril, para la extracción de las proteínas de cada una de las muestras objeto de estudio. Tras su pulverización con una espátula estéril, se añadieron 200 μl del reactivo de lisis incluido en el *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA[®] kit* (Roche, Suiza), que contiene ARNasa e inhibidores de proteasas. Tras la homogeneización de las muestras, se dejaron reposar en hielo (30 min), y se centrifugaron (12000 rpm, 4°C, 20 min). Tras la finalización de este proceso, se recogió el sobrenadante obtenido en un nuevo tubo estéril, para su posterior conservación a -80°C hasta su uso.

B. Valoración de las proteínas extraídas.

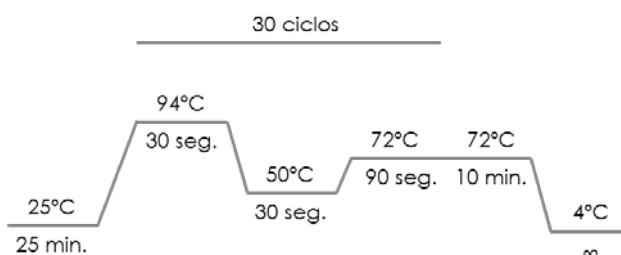
La valoración de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford de 1976 (Bradford, 1976), el cual se basa en el cambio de absorbancia de 465 a 595 nm que se produce en respuesta a la adición de proteínas a una solución de reactivo *Coomassie[®] Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad, EE.UU.). Las interacciones hidrofóbicas e iónicas producidas por los aminoácidos básicos, estabilizan la forma iónica del reactivo, causando un cambio de color. La concentración de proteínas se determinó a partir de la absorbancia medida espectrofotométricamente a 595 nm, de una solución de 4 μl de la muestra en 1 ml de reactivo Bradford diluido (1:5), y con respecto a una curva de calibrado de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de 2mg/ml (Bio-Rad, EE.UU.). Cada una de las determinaciones se realizó por duplicado.

3.4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA.

El análisis de la actividad telomerasa fue realizado empleando una extensión del método original, descrito por Kim et al. en 1994 (Kim et al., 1994). Este procedimiento permite la amplificación altamente específica de los productos de elongación de la telomerasa, y su detección mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para ello, se utilizó el *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA*® kit (Roche, Alemania).

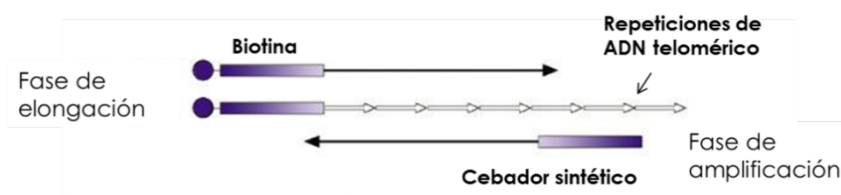
Primero, se sometió a las muestras a una fase de elongación en la que la enzima telomerasa, presente en 1.5 µg de extracto proteico, añade repeticiones de ADN telomérico al extremo 3'-OH de un cebador sintético, marcado con biotina (P1-TS). Posteriormente, se sometieron a una fase de amplificación, siguiendo el programa indicado en la **Figura 3.8**. Los productos de elongación anteriores se amplificaron por PCR empleando los cebadores sintéticos P1-TS y P2, en presencia de una mezcla de reacción que contenía nucleótidos, enzima Taq polimerasa (*Thermus aquaticus* polimerase), y una solución tampón para asegurar que las condiciones fueran las óptimas.

Figura 3.8
Programa de PCR para la amplificación de los fragmentos teloméricos añadidos por telomerasa.



Como resultado, se obtuvieron productos amplificados de distinta longitud, que diferían entre ellos en las 6 pb de la secuencia telomérica (**Figura 3.9**). Como control positivo, se utilizó un extracto celular de una línea humana de células embrionarias de riñón, immortalizadas por un aumento de la expresión de telomerasa. Como control negativo se

Figura 3.9
Esquema de la fase de elongación y amplificación por PCR de las secuencias teloméricas en el ensayo TRAP. Adaptado de <https://www.roche-applied-science.com>.



empleó el mismo extracto celular, tratado con ARNasa para provocar la degradación del componente ARN de la enzima, esencial para su funcionamiento.

En la segunda parte del ensayo, se procedió a la desnaturalización (T^a ambiente, 10 min) de los productos de amplificación obtenidos y, a continuación, fueron sometidos a una detección por ELISA (**Figura 3.10**). El producto de PCR fue hibridado con 225 μ l de una solución que contenía una sonda específica P3 marcada con digoxigenina, cuya secuencia es complementaria a la de las repeticiones teloméricas. Después, fue inmovilizado por medio del *primer* P1-TS en los pocillos recubiertos de estreptavidina de la placa de ELISA (37°C, 2 h).

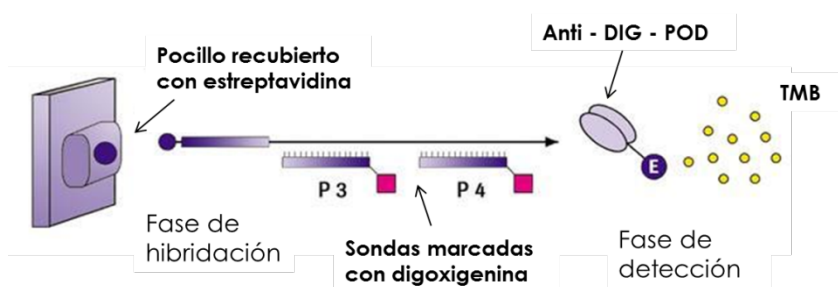


Figura 3.10
Esquema de la detección por ELISA llevada a cabo para la determinación de la actividad telomerasa. Adaptado de <https://www.roche-applied-science.com>.

Posteriormente, se realizó una incubación con 100 μ l de un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa, en agitación orbital (300 rpm, T^a ambiente, 30 min). Por último, se incubaron los pocillos con 100 μ l del sustrato tetrametilbenzidina (TMB), también en agitación orbital (300 rpm, T^a ambiente, 15 min). La peroxidasa cataliza la conversión del sustrato TMB a un producto coloreado, cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de ADN telomérico añadido por la telomerasa.

Finalmente, se paralizó la reacción con 100 μ l de una solución de ácido sulfúrico al 5%, y se realizó la lectura de la absorbancia de la placa a 450nm, empleando una longitud de onda de referencia de 690nm con el lector de placas *Microplate Reader* (Bio-Rad, EE.UU.). Cada una de las muestras fue analizada por duplicado.

Se definieron como muestras con actividad telomerasa positiva, aquellas en las que la diferencia de las absorbancias ($A_{450nm} - A_{690nm}$) fue superior a 0.2. Los controles positivo y negativo se consideraron válidos cuando dicha diferencia de absorbancias fue superior a 1.5 e inferior a 0.2, respectivamente. Los análisis fueron realizados con el programa informático *Microplate Manager 3.0* (Bio-Rad, EE.UU.).

3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

3.5.1 AISLAMIENTO DE ARN.

A. Extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó siguiendo el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi en 1987 (Chomczynski y Sacchi, 1987), con algunas modificaciones. Este método consiste en la extracción de ARN de un tejido con una mezcla de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo.

Se partió de 20 cortes de tejido de 20 μm de grosor, conservados a -80°C , a los que se añadió 1 ml de TRIzol[®] (Invitrogen, EE.UU.), homogeneizando bien la mezcla. El TRIzol[®] es un agente monofásico compuesto por fenol e isotiocianato de guanidina que protege la integridad del ARN, mientras se rompen las células y se disuelven el resto de componentes celulares. Se mantuvieron los tubos 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 μL de cloroformo, y se mezcló bien con la ayuda de un agitador mecánico. Tras tres minutos de reposo, se centrifugaron las muestras (13200 rpm, 4°C , 15 min) para separar la fase acuosa, en la que se encuentra el ARN, de la fase orgánica, que arrastra el resto de componentes. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo estéril y se añadieron 500 μL de 2-propanol para su precipitación a -20°C , durante toda la noche.

Tras este tiempo, y después de centrifugar nuevamente (13200 rpm, 4°C , 15 min), se obtuvo un precipitado blanco, que se lavó con etanol frío al 70% (v/v), y se dejó secar a temperatura ambiente para ser diluido, posteriormente, en 25 μL de agua ultrapura estéril (AUE). El ARN fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

B. Valoración de la concentración, pureza e integridad del ARN extraído.

La cuantificación y la valoración de la pureza del ARN extraído se realizaron mediante lectura espectrofotométrica, procediendo de forma similar a la valoración de la concentración y pureza del ADN, explicado anteriormente en el punto 3.2.1. La absorbancia a 260 nm fue utilizada para su cuantificación, teniendo en cuenta que cada unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de ARN de cadena sencilla (Sambrook et al., 1988).

La integridad del ARN extraído fue verificada también mediante electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad, EE.UU.) al 0.8% (p/v) en tampón TBE 1X, de 1 µg de ARN de cada muestra extraída, procediendo de igual forma que en el caso de la valoración de la integridad del ADN, como se explica en el apartado 3.2.1.

3.5.2 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO.

Una reacción de retro-transcripción (RT) consiste en la síntesis de una molécula de ADN complementario (ADNc), a partir de una hebra simple de ARN mensajero (ARNm) utilizada como molde. Para ello, fue utilizado el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies, EE.UU.), que utiliza *primers* aleatorios que se unen a distintas secuencias del ARN mensajero de forma indiscriminada, y la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL) con actividad transcriptasa inversa.

MEZCLA DE REACCIÓN	Componentes	Volumen (µl)	Tabla 3.7 Componentes de la mezcla de reacción para la retro-transcripción.
	Tampón 10x	10	
	dNTPs 25x	4	
	<i>Random Primers</i> 10x	10	
	Enzima (50U/µl)	5	
	Inhibidor ARNasas	2.5	
	AUE	18.5	

Se partió de 4 µg de ARN de cada muestra, diluidos en 50 µl de AUE, a los que se añadió 50 µl de una mezcla de reacción realizada con los distintos componentes mostrados en la **Tabla 3.7**. Las muestras fueron sometidas a 37°C durante 2 horas, tras un paso

previo de activación de la enzima (25°C, 10 min) en un termociclador. A efectos de cálculos de la concentración de la solución de ADNc, se consideró que el total del ARNm fue transformado.

Tras la síntesis de ADNc, se procedió a comprobar si la reacción de retro-transcripción se había realizado correctamente. Para ello, se llevó a cabo una amplificación por PCR del gen endógeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Se amplificó 1 µl del producto de la retrotranscripción con unos *primers* especialmente diseñados para amplificar una zona exón-exón del gen endógeno (**Tabla 3.8**), ya que el ADN complementario sólo contiene las secuencias codificantes debido a las características intrínsecas del ARN de partida.

GAPDH	Secuencia
	<i>F</i> : 5'-GATCATCAGCAATGCCTCCTG-3' <i>R</i> : 5'-TGGCATGGACTGTGGTCATG-3'

Tabla 3.8
Secuencia de los *primers* utilizados para la ampliación del gen *GAPDH*.

Los componentes necesarios para la reacción de amplificación fueron preparados en 49 µl de una mezcla de reacción (Tampón 1x, MgCl₂ 1 mM, dNTPs 0.2 mM, *primer forward* 0.1 µM, *primer reverse* 0.1 µM, Taq polimerasa 0.025 U/µl) para cada muestra. El programa de amplificación para la PCR de *GAPDH* se muestra en la **Figura 3.11**.

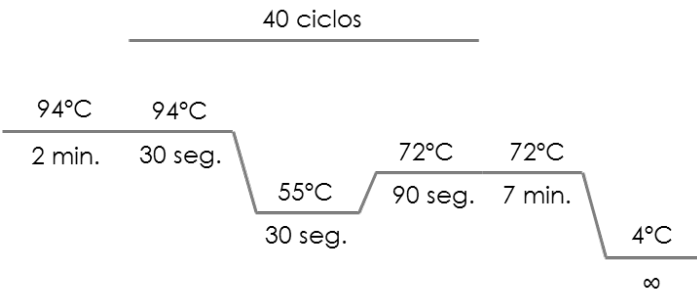


Figura 3.11
Programa de PCR usado para la amplificación del gen *GAPDH*.

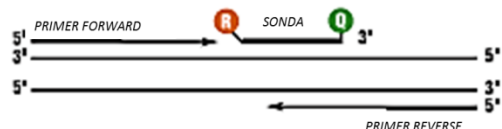
El producto amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 2% (p/v) en TBE 1X, junto al marcador de peso molecular *HyperLadder*[®] V (Bioline, UK), para comprobar que la transformación en ADNc se había realizado correctamente y por igual en todas las muestras.

3.5.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.

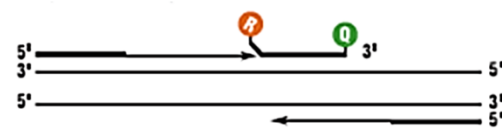
3.5.3.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE SONDAS *TaqMan*[®].

La PCR cuantitativa a tiempo real es un método ampliamente utilizado en los análisis de expresión génica, ya que permite determinar cambios en el nivel de expresión de un gen de interés en una muestra de tejido tumoral, en relación al nivel de expresión del mismo gen de interés en una muestra de tejido no tumoral usada como referencia.

1. Polimerización: La sonda *TaqMan*[®] se encuentra unida a un fluoróforo y un quencher en sus extremos 5' y 3' respectivamente.



2. Elongación: Cuando la sonda está intacta, el quencher está inhibiendo la acción del fluoróforo.



3. Fragmentación: Durante la fase de extensión, la ADN polimerasa rompe la unión del fluoróforo con la sonda.



4. Amplificación completa: Una vez separado del quencher, el fluoróforo emite su fluorescencia.

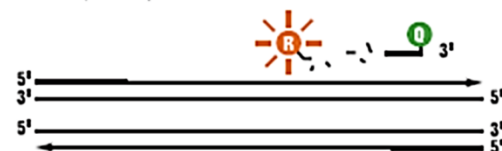


Figura 3.12
Esquema sobre la emisión de fluorescencia en una Q-PCR, mediante el empleo de sondas *TaqMan*[®].

Se empleó la misma técnica que para la determinación de la longitud telomérica por PCR cuantitativa a tiempo real, cuyo fundamento ha sido explicado en el apartado 3.3.2 pero, en este caso, se empleó como fluorocromo un tipo de molécula conocida como sonda *TaqMan*[®], que posee especificidad con una parte de la secuencia del gen objeto de estudio.

A partir de 20 ng de ADNc, se amplificó el gen diana gracias al uso de unos oligonucleótidos específicos, y una sonda comercial (ambos componentes del *TaqMan*[®] Gene Expression Assay (Life Technologies, EE.UU.)). Este tipo de sonda, posee en el extremo 5' un agente fluoróforo (6-FAM), y en el

extremo 3' un agente amortiguador no fluoróforo (*Non Fluorescent Quencher*, NFQ). Como medio de reacción se usaron 10 µl de *FastStar Universal Probe Master (ROX) 2X* (RO-

CHE, Alemania), que incluía la enzima *FastStar Taq DNA Polimerase* y todo lo necesario para que las condiciones de reacción fueran las óptimas, a los que se añadió 1 µl de *TaqMan® Gene Expression assay* correspondiente, y la muestra, en 20 µl de volumen final. Como control interno se utilizó un gen endógeno de expresión constitutiva, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), cuya expresión fue analizada en paralelo a la de los genes objeto de estudio, en cada una de las muestras. Todos los análisis fueron realizados por triplicado en el *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, EE.UU.) sometiendo a las muestras al siguiente programa de amplificación (95°C 10 min, 40 ciclos de: 95°C 15 seg, 60°C 1 min).

Durante la reacción, la sonda y los *primers* se unen a sus secuencias complementarias, dando lugar al comienzo de la síntesis de la hebra complementaria por la ADN polimerasa. Mientras la sonda se encuentra íntegra, unida a la hebra de ADNc, se produce la amortiguación de la fluorescencia del fluoróforo, pero una vez la ADN polimerasa alcanza su posición se produce la ruptura de la sonda liberando el fluoróforo del extremo 5', que comenzará a emitir fluorescencia al dejar de estar influenciado por el *quencher* (Figura 3.12). Las características de las sondas utilizadas para los distintos genes analizados mediante esta técnica se describen en la **Tabla 3.9**.

	Especie	Referencia Gen Bank®	Tamaño del amplicón	Referencia sondas <i>TaqMan</i> ®
<i>ADAM15</i>	Humano	NM_003815.4	74	Hs00984794_m1
<i>ADAM23</i>	Humano	NM_003812.3	110	Hs00187022_m1
<i>CASP3</i>	Humano	NM_004346.3	100	Hs00234387_m1
<i>DHH</i>	Humano	NM_021044.2	98	Hs00368306_m1
<i>GAPDH</i>	Humano	NM_002046.4	124	Hs99999905_m1
<i>HTRA-2</i>	Humano	NM_013247.4	59	Hs00234883_m1
<i>IHH</i>	Humano	NM_002181.3	103	Hs01081801_m1
<i>SHH</i>	Humano	NM_000193.2	99	Hs01123832_m1
<i>TIMP2</i>	Humano	NM_003255.4	73	Hs00234278_m1
<i>TRF1</i>	Humano	NM_017489.2	209	Hs00819517_m1
<i>TRF2</i>	Humano	NM_005652.4	75	Hs00194619_m1

Tabla 3.9
Características de las sondas *TaqMan*® utilizadas en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Para realizar el análisis de los resultados, se utilizó el método del "Delta Delta Ct" ($\Delta\Delta Ct$) (Livak y Schmittgen, 2001). Este procedimiento es muy útil para una rápida estimación del ratio de expresión relativa de un gen. Primero se normaliza cada muestra, restan-

do el Ct de la muestra para el gen objeto de estudio y el Ct de la muestra para el gen endógeno ($\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$). Posteriormente, se calcula la diferencia entre el ΔCt de la muestra tumoral con respecto a la muestra control ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra tumoral}} - \Delta Ct_{\text{muestra no tumoral}}$), en nuestro caso, la muestra de tejido no tumoral del mismo paciente. Para aplicar dicho método, es necesario que la eficiencia de amplificación de ambos genes sea similar y óptima; en el caso del empleo de sondas *TaqMan*[®] se considera del 100% ($E = 2$). Por tanto, la cuantificación relativa o RQ (*relative quantification*), expresada como un valor exponencial, fue $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5.3.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MATRICES PERSONALIZADAS.

Se trata de una técnica que nos permite analizar de una sola vez, la expresión de varios genes de nuestra elección en las muestras objeto de estudio. De esta forma, se cuantificó la expresión de 31 genes codificantes para distintas proteasas relacionadas con el desarrollo del cáncer gástrico, por PCR cuantitativa a tiempo real mediante el empleo del sistema *TaqMan*[®] Array Micro Fluidic Cards (Life Technologies, EE.UU.). Para ello, se diseñó una matriz a medida, cuyos pocillos estaban marcados con *TaqMan*[®] Gene Expression Assays específicos para cada uno de los 31 genes seleccionados. Se incluyó también en la placa el análisis correspondiente a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), que fue usado, de nuevo, como control interno. En cada una de dichas placas se analizó la muestra de tejido tumoral, y la correspondiente muestra de tejido no tumoral, de cada paciente, que fue tomada como referencia.

Se preparó una dilución de 2 ng/μl, de ADNc de cada muestra, en 100 μl de AUE; a los que se añadieron 100 μl de *TaqMan*[®] Gene Expression Mas-

ter Mix (Life Technologies, EE.UU.). Se transfirieron 100 μl de la mezcla a cada uno de los reservorios correspondientes (dos para cada muestra), situados en la parte superior de la placa, desde los que fue accediendo por capilaridad a cada uno de los pocillos, tal y como se muestra en la **Figura 3.13**.

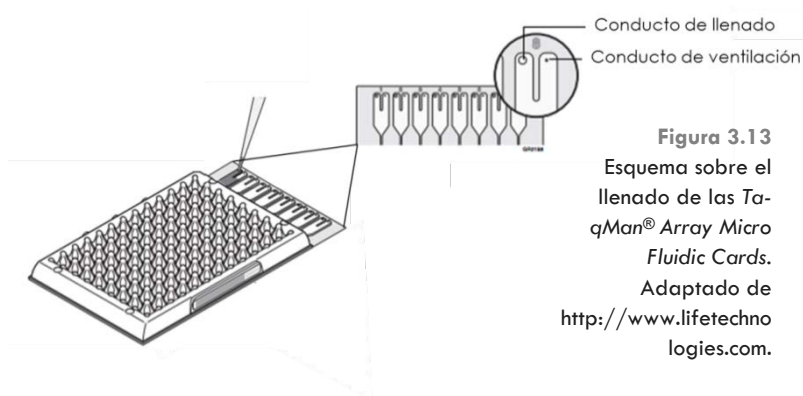


Figura 3.13
Esquema sobre el llenado de las *TaqMan*[®] Array Micro Fluidic Cards. Adaptado de <http://www.lifetechnologies.com>.

Una vez que la placa estaba totalmente cargada, se introdujo en el 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, EE.UU.), y se sometió al mismo ciclo de amplificación descrito en el apartado anterior para la Q-PCR mediante sondas *TaqMan*[®]; al igual que los resultados, que fueron analizados siguiendo el mismo método (Livak y Schmittgen, 2001). Las características de las sondas *TaqMan*[®] utilizadas en el diseño de la placa se muestran en la **Tabla 3.10**.

	Especie	Referencia Gen Bank [®]	Tamaño del amplicón	Referencia sondas <i>TaqMan</i> [®]
ACE	Humano	NM_000789.3	74	Hs00174179_m1
ADAM10	Humano	NM_001110.2	83	Hs00153853_m1
ADAM12	Humano	NM_003465.3	82	Hs01106104_m1
ADAM15	Humano	NM_003815.4	74	Hs00984794_m1
ADAM23	Humano	NM_003812.3	110	Hs00187022_m1
ADAM9	Humano	NM_003816.2	64	Hs00177638_m1
ADAMTS18	Humano	NM_199355.2	81	Hs00373501_m1
CASP1	Humano	NM_001223.4	113	Hs00236158_m1
CASP3	Humano	NM_004346.3	100	Hs00234387_m1
CASP5	Humano	NM_004347.3	143	Hs00362072_m1
CTSB	Humano	NM_001908.3	99	Hs00947439_m1
CTSD	Humano	NM_001909.4	103	Hs00157205_m1
CTSL	Humano	NM_001912.4	88	Hs00266474_m1
DHH	Humano	NM_021044.2	98	Hs00368306_m1
GAPDH	Humano	NM_002046.4	124	Hs99999905_m1
HTRA-2	Humano	NM_013247.4	59	Hs00234883_m1
IHH	Humano	NM_002181.3	103	Hs01081801_m1
KLK10	Humano	NM_002776.4	71	Hs00173611_m1
KLK6	Humano	NM_002774.3	119	Hs00160519_m1
MMP1	Humano	NM_002421.3	64	Hs00899658_m1
MMP13	Humano	NM_002427.3	91	Hs00233992_m1
MMP14	Humano	NM_004995.3	66	Hs00237119_m1
MMP2	Humano	NM_004530.4	83	Hs00234422_m1
MMP3	Humano	NM_002422.3	126	Hs00968305_m1
MMP7	Humano	NM_002423.3	101	Hs00159163_m1
MMP9	Humano	NM_004994.2	79	Hs00957555_m1
SERPINE1	Humano	NM_000602.4	82	Hs00167155_m1
SHH	Humano	NM_000193.2	99	Hs01123832_m1
TIMP1	Humano	NM_003254.2	104	Hs00171558_m1
TIMP2	Humano	NM_003255.4	73	Hs00234278_m1
TIMP3	Humano	NM_000362.4	66	Hs00927216_m1
UCHL-1	Humano	NM_004181.4	100	Hs00188233_m1

Tabla 3.10
Características de las sondas *TaqMan*[®] usadas en las *TaqMan*[®] Array Micro Fluidic Cards.

3.6 CUANTIFICACIÓN DEL ARN TELOMÉRICO (TERRA)

3.6.1 ANÁLISIS DE TERRA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL MEDIANTE SYBR Green®.

La cuantificación de los niveles de TERRA se realizó por PCR cuantitativa a tiempo real, usando como fluoróforo SYBR Green®. La metodología fue similar a la utilizada para la determinación de la longitud telomérica por la misma técnica. La principal diferencia entre ambos experimentos es que, en este caso, el análisis se realiza a partir de ADNc.

Se realizaron dos reacciones de amplificación por muestra, cada una de las cuales contenía 40 ng de ADNc, a los que se añadieron 5 µl de la mezcla de reacción *FastStar Universal SYBR Green Master (ROX) 2X* (ROCHE, Alemania), y los *primers* correspondientes para la amplificación del ARN telomérico, y del gen de copia única RPLP0, utilizado como control, en 10 µl de volumen final. En este caso, se usaron los mismos *primers* y en las mismas condiciones que para la determinación de la longitud telomérica (véase apartado 3.3.2), ya que la secuencia de TERRA es un transcrito de la misma. Por lo tanto, se emplearon 900 nM del *primer forward* y 300 nM del *primer reverse* para la amplificación de TERRA, y 500 nM del *primer forward* y 300 nM del *primer reverse* para la amplificación del gen de copia única RPLP0.

Las curvas estándar para determinar la eficiencia del experimento se realizaron también mediante diluciones 1/10 de ADN de células HeLa, y la muestra de referencia utilizada fue el tejido no tumoral de cada paciente. Todas las muestras se amplificaron por triplicado en el *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, EE.UU.), y los resultados fueron analizados según el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), teniendo en cuenta la eficiencia de cada uno de los experimentos realizados.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se desarrolló mediante el uso del software IBM SPSS Statistics 19.0 (International Business Machines, EE.UU.). El análisis del grado de asociación entre dos variables nominales, se realizó mediante el estadístico de contraste Chi-cuadrado (χ^2), asumiendo una asociación de dependencia si $p < 0.05$. En el caso de comparar una variable cuantitativa frente a una variable categórica, se llevó a cabo un análisis previo para conocer si dicha variable cumplía los requisitos de normalidad en su distribución. Para ello, se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, y Shapiro-Wilk, asumiendo que la variable presentaba una distribución normal si el valor de p era > 0.05 . Cuando dicho criterio se cumplía, se llevó a cabo una comparación de los intervalos de confianza de las medias, mediante la prueba t de Student en el caso de un estudio entre dos grupos; o bien, se usó el análisis de la varianza (ANOVA de una vía) para comparar medias de tres o más grupos. En el caso de no cumplir los criterios de normalidad, las pruebas no paramétricas utilizadas fueron U de Mann-Whitney, y Kruskal Wallis, respectivamente.

Para comparar diferencias entre las medias de dos variables cuantitativas relacionadas, se utilizó como prueba no paramétrica la prueba de rangos de Wilcoxon. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p era < 0.05 ; y se calculó el error típico (e.t.) para determinar la desviación de la media para cada variable.

Se utilizaron técnicas de correlación para evaluar la fuerza de asociación entre dos variables cuantitativas. Esta relación viene determinada por el coeficiente de correlación de Pearson, cuyo cálculo es paramétrico, o bien, por el coeficiente de correlación Rho de Spearman, en el caso de que las variables se consideren no paramétricas. Ambos coeficientes son valores adimensionales, y nos dan idea del grado de relación existente entre dos variables, y si esta relación es directa o indirecta. Si $r < 0.3$, la asociación entre dos

variables es débil; si el valor de r está comprendido entre ≥ 0.3 y ≤ 0.7 , la asociación es moderada; mientras que si r es > 0.7 , la asociación es fuerte. Se utilizaron también técnicas de regresión para determinar si esta relación, entre dos variables cuantitativas, era lineal o no.

Los estudios de pronóstico se llevaron a cabo siguiendo el método de Kaplan-Meier, estimando la significación estadística mediante el test de Log-Rank, cuando p fue < 0.05 . Este método nos da idea de la probabilidad de no recurrencia de cada paciente, a lo largo del tiempo. Para ello, se empleó el intervalo libre de enfermedad (ILE), definido como el tiempo en meses transcurrido desde la resección quirúrgica hasta la detección de recidiva tumoral, tomando como valor medio de seguimiento de los pacientes 5 años. Aquellos pacientes cuyo seguimiento no fue completo debido a una pérdida de contacto con ellos en un instante determinado, o bien no había recidivado en la fecha de finalización del estudio, se consideraron como casos censurados. Así mismo, se excluyeron de este tipo de análisis aquellos pacientes que presentaron tumores gástricos de estadio IV, o bien, sufrieron muerte post-operatoria. En los casos en los que fue necesario, se llevó a cabo un análisis multivariable por regresión de Cox para identificar qué factores tienen, de forma independiente del estadio tumoral, una influencia significativa sobre la recaída de los pacientes.

Resultados y discusión

4

4.1 FENOTIPO MUTADOR EN CÁNCER GÁSTRICO

4.1.1 CLASIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE TUMORES GÁSTRICOS EN FUNCIÓN DEL GRADO DE INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

Se procedió a la clasificación de la población de tumores gástricos objeto de estudio, en función de su grado de inestabilidad en secuencias microsatélite. Para ello, se seleccionó el panel de referencia descrito por Suraweera en 2002 (Suraweera et al., 2002), el cual establecía cinco secuencias repetitivas como marcadores para la identificación de este tipo de alteraciones, por la frecuente presencia de inestabilidad en sus regiones microsatélite.

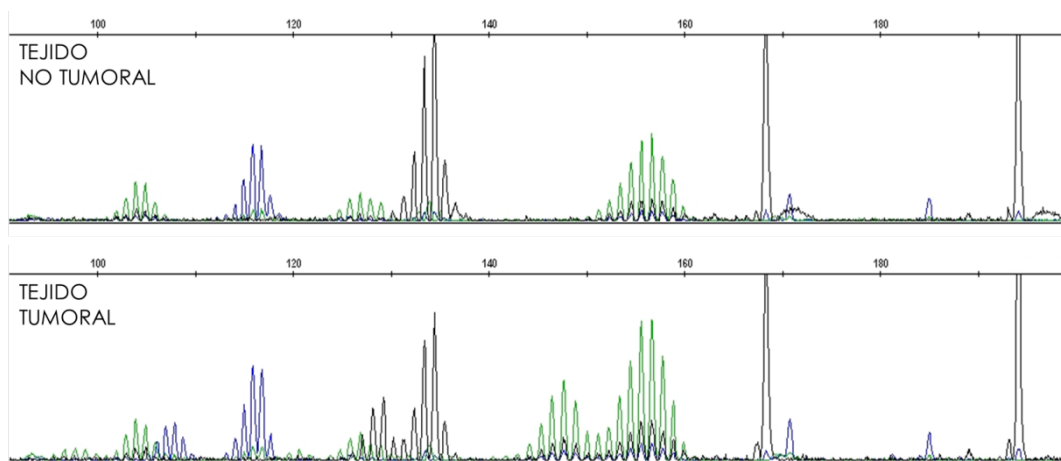
De las 85 muestras que formaron parte de la población de tumores de estómago, dos de ellas no pudieron ser analizadas por degradación del ADN extraído, haciendo imposible su inclusión en este estudio. En total, 15 (18.1%) de las muestras mostraron un perfil de alta inestabilidad, ya que presentaron alteraciones en dos o más de los marcadores analizados y, por tanto, fueron clasificadas como tumores con alta inestabilidad en secuencias microsatélite (MSI-H) (Figura 4.1). Los tumores gástricos clasificados en el grupo de alta inestabilidad en microsatélites se consideran desarrollados por la vía del fenotipo mutador, ya que la presencia de este tipo de mutaciones es una característica propia de esta vía carcinogénica. Las restantes 68 (81.9%) muestras fueron clasificadas como de baja inestabilidad en secuencias microsatélite o estables (MSI-L/MSS), al presentar inestabilidad en uno o ninguno de los marcadores, respectivamente (Tabla 4.1).

	Nº casos	(%)
MSI-H	15	18.1
MSI-L/MSS	68	81.9
Total	83	100

Tabla 4.1
Clasificación de la población de tumores gástricos según su grado de inestabilidad en microsatélites.

Se ha descrito que los tumores que presentan un bajo grado de inestabilidad (MSI-L) muestran parámetros clínicos y patológicos muy similares a aquellos tumores considerados como estables (MSS), por esta razón, se decidió clasificarlos dentro de un mismo grupo (Boland et al., 1998; Gafà et al., 2000).

Figura 4.1
Análisis de una muestra tumoral clasificada como MSI-H, que presenta inestabilidad en varios de sus marcadores.



La presencia de inestabilidad en microsatélites juega un importante papel en el desarrollo del cáncer gástrico. Los tumores desarrollados por la vía del fenotipo mutador se caracterizan por presentar este tipo de mutaciones en los genes responsables de las vías de reparación del ADN (*MMR*, *mismatch repair genes*); así como cambios epigenéticos en las regiones promotoras de estos genes, lo que provoca el silenciamiento de su transcripción (Shokal y Sharma, 2012). La inestabilidad en microsatélites fue primeramente asociada al desarrollo de tumores colorrectales hereditarios no polipósicos (HNPCC). Más tarde, se observaron este tipo de alteraciones en, aproximadamente, un 12 - 15% de los tumores colorrectales de origen esporádico (Lin et al., 2012). Posteriormente, la vía del fenotipo mutador fue asociada con otros tipos tumorales, como el cáncer de estómago, el cáncer de endometrio y el cáncer de ovario principalmente. Además, se ha observado que una pequeña proporción de algunos tipos de cáncer de pulmón, de mama o de piel también se desarrollan por esta vía carcinogénica (Boland et al., 1998).

Son muchos los estudios que han investigado la implicación de la inestabilidad en microsatélites en el desarrollo de los carcinomas gástricos. El porcentaje de tumores de estómago que presentan inestabilidad en microsatélites es superior al observado en cáncer colorrectal, ya que se encuentra en el 15 - 25% de los casos (Halling et al., 1999; Falchetti et al., 2008; Corso et al., 2009). En nuestra población de pacientes afectados de

cáncer de estómago se encontró que un 18.1% de ellos presentaban tumores desarrollados por esta vía carcinogénica y, por tanto, se mantenía la concordancia con los datos encontrados en la literatura respecto al porcentaje de tumores atribuibles a este tipo de alteraciones. En todos estos estudios, se observa además que los tumores gástricos con inestabilidad en microsatélites presentan una serie de características clínico-patológicas concretas, contribuyendo a considerarlos como un grupo independiente de tumores de estómago.

4.1.1.1 INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES Y VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Una vez clasificada nuestra población de tumores gástricos según su grado de inestabilidad en microsatélites, se realizó un estudio comparativo de los grupos en relación con las variables clínico-patológicas disponibles.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distribución de los pacientes con tumores MSI-H frente a los MSI-L/MSS en relación al sexo o la edad; sin embargo, se encontraron diferencias próximas a la significación estadística en relación al tipo histológico de los tumores, y su localización. De los 14 tumores MSI-H de los que se disponía de esta información, 12 (85.7%) fueron histológicamente clasificados como tipo intestinal, frente a 2 (14.3%) que presentaron una histología de tipo difuso ($p = 0.058$; Chi-cuadrado). Respecto a la localización anatómica del tumor, el 100% de los tumores gástricos desarrollados por la vía del fenotipo mutador mostraron tener una localización distal o media ($p = 0.070$; Chi-cuadrado).

También se observó una asociación significativa entre el grado de inestabilidad en microsatélites y el grado de invasión ganglionar, ya que 9 de los 15 pacientes con tumores MSI-H (60.0%) no mostraron ningún ganglio afectado, frente a 20 de los 63 (31.7%) pacientes con tumores MSI-L/MSS; siendo esta asociación significativa ($p = 0.042$; Chi-cuadrado). Además, cabe destacar también que ninguno de los pacientes con tumores de alta inestabilidad en microsatélites presentaba metástasis en el momento de la intervención, aunque esta asociación no fue significativa ($p = 0.145$; Chi-cuadrado) (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2
Clasificación de la población de tumores gástricos según su inestabilidad en microsatélites y su relación con las variables clínico-patológicas (*Chi-cuadrado).

			MSS/MSI-L		MSI-H		p*
Total			Nº casos (%)		Nº casos (%)		
SEXO	Varón	46	38	(82.6)	8	(17.4)	0.857
	Mujer	37	30	(81.1)	7	(18.9)	
EDAD	≤ 73 años	42	33	(78.6)	9	(21.4)	0.452
	> 73 años	40	34	(85.0)	6	(15.0)	
TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	26	24	(92.3)	2	(7.70)	0.058
	Intestinal	46	34	(73.9)	12	(26.1)	
LOCALIZACIÓN	Proximal	12	12	(100.0)	0	(0.0)	0.070
	Distal, medio	63	49	(77.8)	14	(22.2)	
TUMOR PRIMARIO (T)	T1, T2	26	23	(88.5)	3	(11.5)	0.223
	T3, T4	52	40	(76.9)	12	(23.1)	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	29	20	(69.0)	9	(31.0)	0.042
	N1, N2, N3	49	43	(87.7)	6	(12.3)	
METÁSTASIS (M)	M0	70	55	(78.6)	15	(21.4)	0.145
	M1	8	8	(100.0)	0	(0.0)	
ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	17	13	(76.5)	4	(23.5)	0.360
	IIa, IIb	22	16	(72.7)	6	(27.3)	
	IIIa, IIIb, IIIc	31	26	(83.9)	5	(16.1)	
	IV	8	8	(100.0)	0	(0.0)	

Respecto al estudio en el que relacionamos la inestabilidad en microsatélites con las distintas características de los tumores de estómago analizados, los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con los descritos en la literatura, ya que los tumores gástricos MSI-H mostraron un perfil clínico-patológico específico, caracterizado por variables representativas de tumores menos agresivos. Los pacientes con este tipo de tumores presentaron un menor grado de invasión ganglionar y ausencia de metástasis en el momento de la intervención quirúrgica. Además, los pacientes estaban afectados por cánceres clasificados en estadios tempranos de la enfermedad. Estos cánceres se desarrollaron mayoritariamente en una localización distal del estómago y con preferencia por el tipo histológico intestinal de la clasificación de Lauren.

Previamente, se había descrito, en una población de 159 pacientes afectados de cáncer gástrico, que los tumores con inestabilidad en microsatélites se correspondían mayoritariamente con un tipo histológico intestinal y mostraban localización distal. Además, los pacientes afectados con este tipo de tumores presentaban mayor tiempo de superviven-

cia medio en el estudio pronóstico a 15 años (Falchetti et al., 2008). Otro estudio realizado en Italia en 250 pacientes afectados de cáncer de estómago, mostró que los 63 pacientes con tumores MSI-H presentaban asociaciones significativas con un menor grado de infiltración local, menor grado de invasión ganglionar y ausencia de metástasis; así como con una localización distal del tumor y un fenotipo histológico intestinal. La tasa de supervivencia, en este caso, también fue favorable en un estudio pronóstico a cinco años (Corso et al., 2009).

Otros trabajos ponen de manifiesto una asociación entre la presencia de inestabilidad en microsatélites y el sexo o la edad de los pacientes, siendo ésta más frecuente en mujeres y personas con edades más avanzadas. En nuestro caso esta asociación no fue significativa (Lee et al., 2002; Park et al., 2013).

4.1.1.2 ESTUDIO PRONÓSTICO EN RELACIÓN CON LA INESTABILIDAD EN SECUENCIAS MICROSATÉLITE DE LOS TUMORES GÁSTRICOS.

Se realizó un estudio de pronóstico en relación con el grado de inestabilidad en secuencias microsatélite de la población de pacientes afectados de cáncer gástrico. Formaron parte del estudio pronóstico 63 pacientes que cumplían los requisitos descritos en el apartado 3.7 de esta tesis. El tiempo de seguimiento de la serie fue de 5 años.

De los 15 pacientes afectados de tumores con inestabilidad en microsatélites, se observó recidiva de la enfermedad en el 14.3% de los casos (2 de 15 pacientes en total); mientras que en el grupo de pacientes que habían desarrollado tumores de baja inestabilidad o estables, su índice de recidiva fue del 43.7% de los casos (21 de 48 pacientes en total). Según el análisis de Kaplan-Meier, el intervalo libre de enfermedad estimado fue superior en el caso de los pacientes con tumores MSI-H, en comparación al grupo de pacientes con tumores MSI-L/MSS. En el primer grupo, el intervalo libre de enfermedad estimado fue de 52.79 ± 4.72 meses (media \pm error típico) frente a 36.35 ± 3.86 meses, en el segundo grupo.

Como se puede observar en la **Figura 4.2**, la probabilidad de recidiva de la enfermedad en los casos con tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites es menor, confiriendo un significativo mejor pronóstico a este grupo de pacientes ($p = 0.030$; Log-Rank).

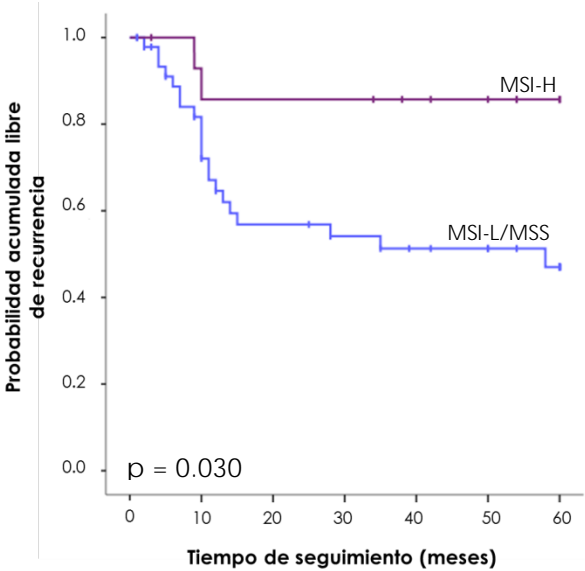


Figura 4.2
Curvas de Kaplan-Meier considerando el grado de inestabilidad en microsatélites de los tumores gástricos.

Con objeto de determinar si la inestabilidad en microsatélites representaba un factor de buen pronóstico, independiente de las variables clínico-patológicas del propio tumor; se procedió a la realización de un análisis multivariable de Cox. Como variable relacionada con el pronóstico se decidió incluir en este análisis el estadio tumoral, tras la realización de un análisis uni-variable. En este se determinó la relación directa del estadio tumoral con el pronóstico de los pacientes, con un nivel de significación de $p < 0.001$. Tal como se observa en la **Tabla 4.3**, la presencia de alta inestabilidad en microsatélites resultó ser un factor de buen pronóstico, independientemente del estadio tumoral. El riesgo relativo de padecer una recidiva fue 4.86 veces superior en el caso de pacientes que presentaron tumores de baja inestabilidad o estables, frente a aquellos pacientes con tumores de alta inestabilidad en microsatélites.

Tabla 4.3
Regresión de Cox considerando el estadio tumoral y la inestabilidad en microsatélites de la población de tumores gástricos seleccionados para el estudio pronóstico.

	Riesgo relativo (RR)	Intervalo de confianza del 95%	p*
ESTADIO (I vs. II, III)	0.072	0.010 - 0.539	0.010
RER (MSI-L/MSS vs. MSI-H)	4.862	1.134 - 20.845	0.033

Por lo tanto, el estudio pronóstico reveló que la presencia de un alto grado de inestabilidad en microsatélites era una característica favorable para los pacientes. Aquellos que presentaron este tipo de tumores mostraron una tasa mayor de tiempo libre de enfermedad. Solamente dos de los pacientes desarrollaron recidiva durante los cinco años posteriores a la resección quirúrgica, respecto al grupo de afectados de tumores (MSI-L/MSS), cuyo intervalo libre de enfermedad fue inferior.

El diferente pronóstico clínico que presentan los pacientes afectados de tumores desarrollados por la vía del fenotipo mutador ha sido ampliamente estudiado, habiendo sido descrito que la inestabilidad en microsatélites representa un factor protector en el cáncer gástrico (Kim et al., 2010; Fang et al., 2012). Un estudio de pronóstico realizado en 169 casos de pacientes con adenocarcinoma gástrico, reveló que los tumores MSI-H confieren un tiempo de supervivencia dos veces superior que los tumores MSI-L o MSS; estos últimos, además, presentaban mayor tendencia a desarrollar metástasis durante el periodo de seguimiento (Schneider et al., 2000). Otro trabajo posterior, realizado en pacientes que fueron sometidos a cirugía de intención curativa, mostró que los pacientes con tumores MSI-H presentaban una mejor tasa de supervivencia tras cinco años de seguimiento y mayor intervalo de tiempo libre de enfermedad, considerando los tres años siguientes a la cirugía (Fang et al., 2012).

En el caso del cáncer colorrectal, los pacientes afectados de tumores con inestabilidad en microsatélites también presentan mayores tasas de supervivencia global, así como de intervalo de tiempo libre de recidiva, por lo que muchos estudios consideran la presencia de este tipo de alteraciones como un factor pronóstico favorable en cáncer de colon (Hong et al., 2012; Lin et al., 2012). Sin embargo, para el cáncer de endometrio, la influencia de la inestabilidad en microsatélites en el pronóstico de los pacientes no está tan clara. Una revisión de los últimos estudios de pronóstico realizados en este tipo tumoral, pone de manifiesto que los resultados obtenidos son contradictorios, ya que, aunque algunos estudios asocian la presencia de inestabilidad en microsatélites con un mejor pronóstico de los pacientes, los resultados entre ellos son muy heterogéneos; mientras que otros asocian la presencia de este tipo de alteraciones con una tasa de supervivencia desfavorable, aunque no de forma significativa (Díaz-Padilla et al., 2013).

El hecho de que nuestros resultados concuerden con estudios anteriores, ayuda a sustentar la utilidad de la detección de inestabilidad en microsatélites como herramienta para la clasificación de los carcinomas gástricos, con un claro significado pronóstico. Además contribuye a considerar nuestra población como representativa, para dar validez a los estudios moleculares posteriores. Por lo tanto, los carcinomas gástricos desarrollados por la vía del fenotipo mutador constituyen un subgrupo de tumores con un pronóstico clínico favorable para los pacientes.

4.2

FUNCIÓN TELOMÉRICA EN CÁNCER GÁSTRICO

4.2.1 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN TUMORES GÁSTRICOS. RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMPACTO PRONÓSTICO.

Se procedió a determinar la longitud telomérica de las 85 muestras de cáncer gástrico que formaban parte de la población objeto de estudio. Esta determinación se realizó tanto en el tejido tumoral como en una muestra de tejido no tumoral de cada paciente, mediante la determinación de la longitud media de los fragmentos de restricción telomérica (TRF). Posteriormente, los resultados fueron validados mediante la determinación de la longitud telomérica por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR), en un subgrupo de casos de dicha población.

4.2.1.1 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN TELOMÉRICA (TRF).

Para cada una de las muestras se determinó el valor de la longitud telomérica media en kilo bases (kb), en función de la distinta intensidad obtenida tras la hibridación de los fragmentos de restricción, con una sonda específica para las repeticiones teloméricas y su posterior revelado por quimioluminiscencia. La imagen resultante fue densitometrada y analizada, comparando el perfil de cada una de las muestras cuando se representa la intensidad de señal frente a la distancia de migración, con el perfil obtenido del marcador de peso molecular utilizado en la técnica (**Figura 4.3**). De esta forma, se obtiene un valor medio de longitud correspondiente a la media de longitudes de todos los fragmentos de restricción de una muestra.

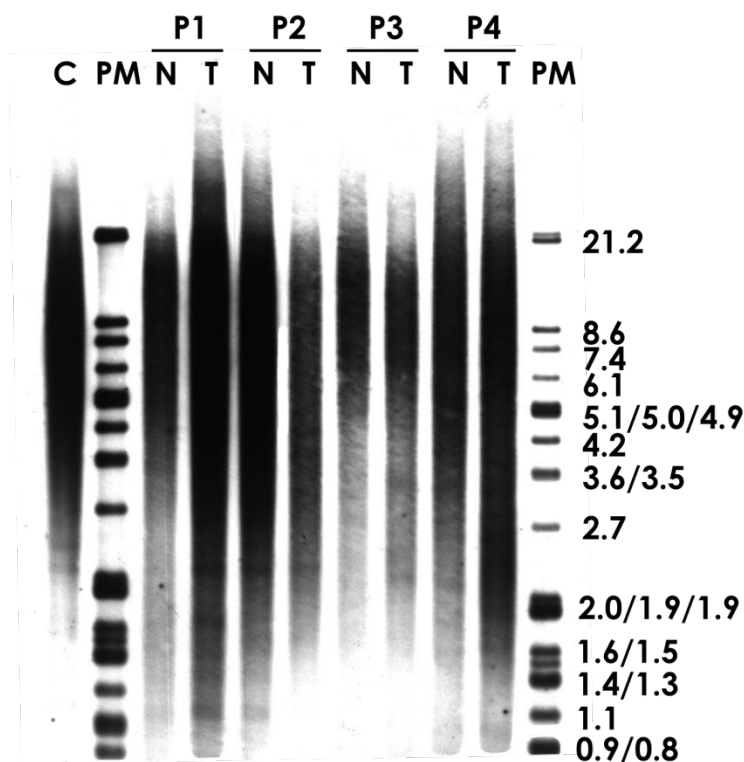


Figura 4.3
Análisis por *southern-blot* de los fragmentos de restricción telomérica de las muestras no tumorales (N) y tumorales (T), de cuatro pacientes (P) afectados de cáncer gástrico. PM = Peso molecular, C = Control.

La longitud media de los telómeros de las muestras no tumorales fue de 5.96 ± 0.23 kb (media \pm error típico), mientras que la longitud media de los telómeros de las muestras tumorales fue de 5.25 ± 0.28 kb. Los telómeros de las muestras tumorales fueron significativamente más cortos que los telómeros del tejido no tumoral, usado como referencia ($p = 0.001$; Wilcoxon). Una de las 85 muestras no pudo ser analizada por falta de suficiente tejido disponible. Se observó además, la existencia de una correlación positiva entre la longitud de los telómeros de las muestras no tumorales y la longitud de los telómeros de las muestras tumorales (coeficiente de correlación $r = 0.479$; $p < 0.001$; Rho de Spearman) (**Figura 4.4**).

Posteriormente, se utilizaron los valores de la longitud telomérica de los tejidos no tumoral y tumoral de cada paciente para determinar el ratio T/N. Este ratio se define como el cociente entre la longitud telomérica de la muestra tumoral (TRF T), y la longitud telomérica de la muestra no tumoral (TRF N). Se consideraron tumores con acortamiento telomérico aquellos que mostraron un ratio T/N inferior a 1, y tumores con mantenimiento o alargamiento telomérico aquellos con un ratio T/N igual o superior a 1. La media del ratio T/N de la población fue de 0.92 ± 0.04 (media \pm error típico). De las 84 muestras

analizadas, 54 (64.3%) mostraron una longitud media de sus telómeros inferior al de la correspondiente muestra control; mientras que 30 (35.7%) de las 84 muestras analizadas mostraron mantenimiento o elongación de sus telómeros.

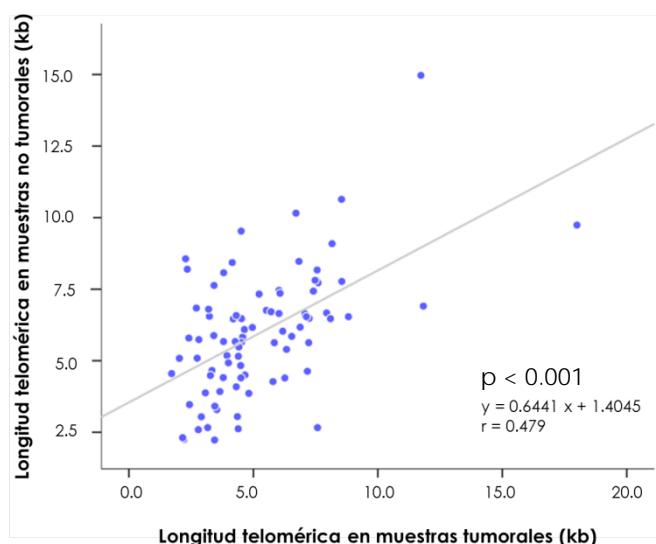


Figura 4.4
Correlación entre la longitud de los telómeros de las muestras no tumorales (TRF N) y de las muestras tumorales (TRF T) en cáncer gástrico.

La inestabilidad genómica es uno de los factores clave que contribuyen al desarrollo del cáncer. Un acortamiento progresivo de los telómeros, tras sucesivos ciclos de replicación, resulta en telómeros disfuncionales que contribuyen a la acumulación de inestabilidad genómica en las células y, finalmente, favorece el desarrollo de un carcinoma (Murnane, 2010).

Por lo tanto, el acortamiento telomérico es uno de los primeros eventos que se producen, junto con la inestabilidad cromosómica y la pérdida de función de genes reguladores como *TP53*, durante la transformación de una lesión displásica precursora hacia el desarrollo de un tumor gástrico maligno (Chin et al., 1999). La presencia de telómeros cortos y alteraciones en los genes implicados en la biología de los telómeros, constituyen eventos moleculares que se producen, frecuentemente, en pacientes con síndromes relacionados con una predisposición al cáncer.

En los últimos años, el número de estudios destinados a conocer la relación entre disfunción telomérica y cáncer se ha incrementado considerablemente. Un meta-análisis de todas las publicaciones relacionadas con este tema, pone de manifiesto una asociación entre el acortamiento telomérico y el desarrollo de algunos tipos de cáncer, como el cán-

cer de esófago, el cáncer de ovario, el cáncer gástrico, el cáncer de riñón o el cáncer de cabeza y cuello. Para otros tipos tumorales, esta relación aún no es tan clara (Wentzensen et al., 2011). Nuestro propio grupo de investigación ha puesto de manifiesto anteriormente la existencia de un acortamiento telomérico significativo en las células tumorales de pacientes afectados de cáncer colorrectal (García-Aranda et al., 2006) y, posteriormente, en tumores no microcíticos de pulmón (Frías et al., 2008).

Los resultados de esta tesis muestran una longitud telomérica inferior en las muestras de tejido tumoral respecto a la longitud telomérica de las células del tejido no tumoral adyacente para los pacientes afectados de cáncer gástrico, definiéndose el grado de acortamiento para cada uno de los casos. Anteriormente, otros trabajos habían relacionado el acortamiento telomérico con el cáncer gástrico. Un estudio realizado en una población con alto riesgo de padecer este tipo de tumores, relacionó la presencia de acortamiento telomérico con los principales factores de riesgo implicados en la carcinogénesis gástrica, como es la presencia de infección por *Helicobacter pylori*, el tabaco, o una dieta inadecuada (Hou et al., 2009). Otro estudio realizado en una población de China demostró que pacientes afectados de cáncer gástrico presentaban telómeros de longitudes inferiores a los casos controles, y se asoció con un aumento significativo del riesgo de desarrollar un tumor (Liu et al., 2009).

4.2.1.2 VALIDACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.

En un grupo de muestras, incluidas en el análisis anterior, se realizó también la medida de la longitud telomérica por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR). El objetivo consistió en validar los resultados de longitud telomérica obtenidos por TRF, y la puesta a punto en nuestro laboratorio de una nueva técnica de medida de longitud de telómeros, más rápida, y más económica que el análisis por *southern-blot*. En este caso, el dato obtenido no es una medida exacta de la longitud telomérica, sino un valor denominado ratio T/S, que nos da idea de la longitud relativa de cada muestra, ya sea control o tumoral, respecto a un ADN de referencia.

Esta técnica se realizó en 68 de los 84 pacientes que formaron parte del estudio de medida de la longitud telomérica de los fragmentos de restricción terminal, tanto en las

muestras tumorales como en las correspondientes muestras no tumorales. Tras el análisis, se obtuvo una longitud telomérica relativa de 1.43 ± 0.06 (media \pm error típico) en el caso de las muestras de tejido no tumoral, y de 1.18 ± 0.03 en el caso de las muestras de tejido tumoral. La prueba de Wilcoxon demostró diferencias significativas entre la longitud relativa de los telómeros de las muestras control y la longitud relativa de los telómeros de las muestras tumorales, con un nivel de significación de $p < 0.001$, igual que el obtenido en el análisis por TRF. Con estos datos se calculó el grado de acortamiento presente en los telómeros de las muestras tumorales respecto a sus muestras control. El ratio T/N fue definido como el ratio entre la longitud relativa de los telómeros en el tejido tumoral y la longitud relativa de los telómeros en el tejido no tumoral, siendo el valor medio obtenido de 0.88 ± 0.03 (media \pm error típico).

Para comparar los resultados obtenidos por ambos métodos, se realizó un análisis de correlación entre el ratio T/S de cada una de las muestras analizadas, y su longitud telomérica medida por TRF. El coeficiente de correlación encontrado fue de $r = 0.786$ $p < 0.001$; Rho de Spearman; que muestra que el grado de similitud entre ambas técnicas es elevado (**Figura 4.5 (A)**). En el caso del grado de acortamiento telomérico que presentaban los tumores, también se estableció una asociación entre los ratios T/N obtenidos por cada una de las técnicas. En este caso el nivel de asociación fue moderado, siendo el coeficiente de correlación de $r = 0.629$ $p < 0.001$; Rho de Spearman (**Figura 4.5 (B)**). Estos datos indicaron que existía una fuerte relación entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos.

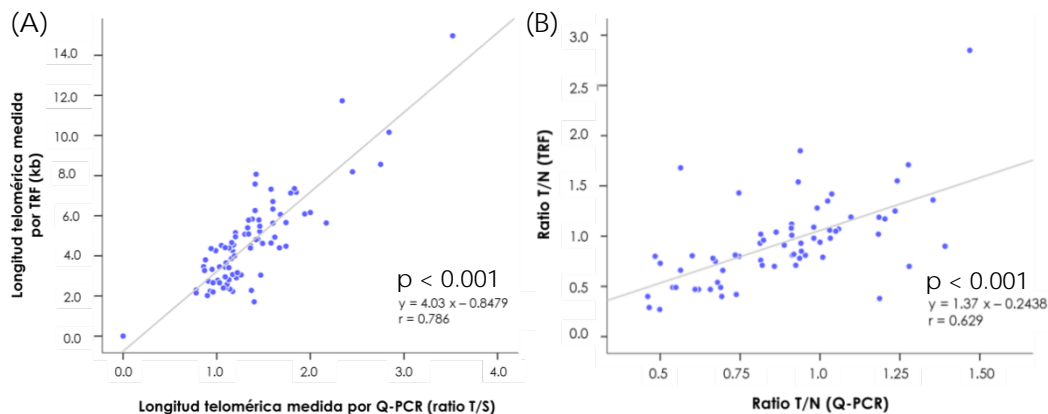


Figura 4.5
Análisis comparativo entre las técnicas TRF y Q-PCR para la medición de telómeros. (A) Análisis de correlación entre la longitud telomérica medida por TRF y la longitud telomérica relativa obtenida por Q-PCR. (B) Análisis de correlación de los ratios T/N obtenidos por ambos métodos.

4.2.1.3 LONGITUD TELOMÉRICA Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Se procedió a estudiar la relación existente entre la longitud de los telómeros de las muestras no tumorales y tumorales de la población de tumores gástricos, con las distintas variables clínico-patológicas consideradas en el estudio.

Los resultados obtenidos, mostraron una asociación significativa entre la longitud media de los telómeros de las muestras tumorales con respecto al tipo histológico del tumor ($p = 0.041$; U de Mann-Whitney). Los carcinomas gástricos de tipo intestinal presentaban telómeros significativamente más cortos (4.89 ± 0.40 kb), que los tumores de tipo difuso (5.80 ± 0.46 kb).

Se observó un incremento en la longitud de los telómeros en los tumores que presentaban mayor tamaño, mayor grado de invasión hacia los ganglios linfáticos, así como, en aquellos casos que habían desarrollado metástasis en el momento de la intervención, siendo esta asociación estadísticamente significativa solamente en el último caso. El grupo de pacientes con ausencia de metástasis, mostró una longitud media de los telómeros tumorales inferior al grupo de pacientes en los que se había diagnosticado una metástasis (5.02 ± 0.31 kb vs. 6.45 ± 0.55 kb) ($p = 0.024$; U de Mann-Whitney). Nuestros resultados mostraron además, que la longitud telomérica en estadios tempranos de la enfermedad era menor que la observada en tumores de estadios más avanzados, pero de nuevo esta asociación no fue significativa.

Respecto a la longitud telomérica medida en las muestras de tejido no tumoral, no se encontraron diferencias significativas con ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas. Todos estos datos se encuentran detallados en la **Tabla 4.4**.

		Longitud telomérica (kb)				
		Nº casos	TRF N	p*	TRF T	p*
SEXO	Varón	47	6.24 ± 0.33	0.222	5.51 ± 0.42	0.372
	Mujer	37	5.61 ± 0.32		4.91 ± 0.34	
EDAD	≤ 73 años	43	6.24 ± 0.36	0.336	5.33 ± 0.33	0.251
	> 73 años	40	5.64 ± 0.30		5.15 ± 0.47	
TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	27	6.21 ± 0.54	0.959	5.80 ± 0.46	0.041
	Intestinal	46	5.99 ± 0.27		4.89 ± 0.40	
LOCALIZACIÓN	Proximal	12	6.23 ± 0.57	0.686	6.84 ± 1.18	0.119
	Distal, medio	63	6.07 ± 0.28		5.04 ± 0.28	
TUMOR PRIMARIO (T)	T1, T2	26	6.63 ± 0.44	0.189	4.93 ± 0.45	0.657
	T3, T4	53	5.67 ± 0.29		5.28 ± 0.37	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	30	6.19 ± 0.42	0.758	4.89 ± 0.44	0.340
	N1, N2, N3	49	5.86 ± 0.31		5.34 ± 0.38	
METÁSTASIS (M)	M0	71	5.99 ± 0.27	0.994	5.02 ± 0.31	0.024
	M1	8	5.98 ± 0.43		6.45 ± 0.55	
ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	17	6.51 ± 0.60	0.975	4.54 ± 0.59	0.083
	IIa, IIb	22	5.96 ± 0.50		5.82 ± 0.75	
	IIIa, IIIb, IIIc	32	5.72 ± 0.39		4.73 ± 0.33	
	IV	8	5.98 ± 0.43		6.45 ± 0.55	

Tabla 4.4
Correlaciones entre las distintas variables clínico-patológicas estudiadas en cáncer gástrico y la longitud telomérica media de las muestras no tumorales (TRF N) y las muestras tumorales (TRF T). (* U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis).

Se relacionó también el grado de acortamiento telomérico de los tumores gástricos, con los parámetros clínicos de la población objeto de estudio. En este caso, se observó que los tumores gástricos de tipo intestinal mostraban un significativo mayor grado de acortamiento en sus telómeros (0.84 ± 0.05), en comparación a los tumores gástricos de tipo difuso (1.02 ± 0.09); que incluso presentaban un ligero alargamiento en los telómeros respecto a la longitud de los telómeros de las muestras de tejido no tumoral ($p = 0.020$; U de Mann-Whitney).

Con respecto a las características TNM de los tumores de estómago, el grado de acortamiento telomérico fue mayor en el grupo de cánceres primarios clasificados como T1 y T2 (0.74 ± 0.05 vs. 0.99 ± 0.06 ; $p = 0.001$; U de Mann-Whitney). Si tenemos en cuenta el grado de invasión ganglionar, los pacientes que no presentaron afectación de los ganglios linfáticos (N0) también mostraron un nivel de acortamiento telomérico significativamente mayor que los pacientes que sí sufrieron invasión ganglionar (0.80 ± 0.05 vs. 0.97 ± 0.06 ; $p = 0.029$; U de Mann-Whitney). Así mismo, los telómeros tumorales de los pacientes con ausencia de metástasis (M0) tenían un grado de acortamiento de 0.89 ± 0.05 , respecto al 1.09 ± 0.09 que mostraban los telómeros tumorales de los pacientes con

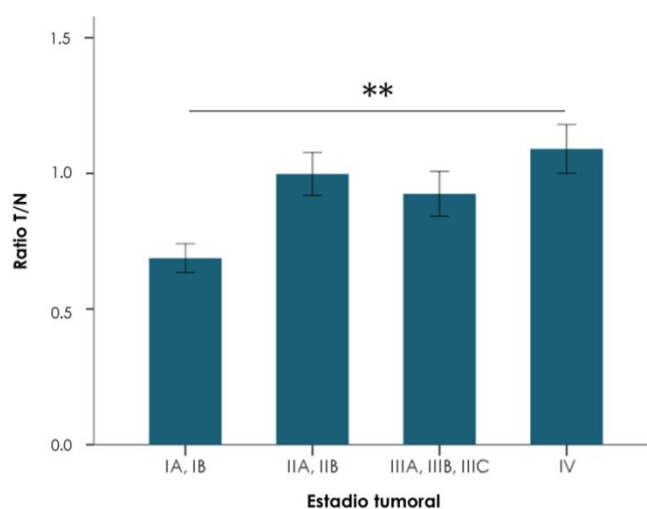
metástasis de la enfermedad (M1), siendo estas diferencias significativas ($p = 0.047$; U de Mann-Whitney), como se observa en la **Tabla 4.5**.

Tabla 4.5
Correlaciones entre las distintas variables clínico-patológicas estudiadas en cáncer gástrico y el grado de acortamiento telomérico en las muestras tumorales respecto a las muestras control (ratio T/N). (* U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis).

		Nº casos	Ratio T/N	p*
SEXO	Varón	47	0.92 ± 0.06	0.939
	Mujer	37	0.93 ± 0.06	
EDAD	≤ 73 años	43	0.91 ± 0.06	0.688
	> 73 años	40	0.94 ± 0.06	
TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	27	1.02 ± 0.09	0.020
	Intestinal	46	0.84 ± 0.05	
LOCALIZACIÓN	Proximal	12	1.08 ± 0.11	0.070
	Distal, medio	63	0.89 ± 0.05	
TUMOR PRIMARIO (T)	T1, T2	26	0.74 ± 0.05	0.001
	T3, T4	53	0.99 ± 0.06	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	30	0.80 ± 0.05	0.029
	N1, N2, N3	49	0.97 ± 0.06	
METÁSTASIS (M)	M0	71	0.89 ± 0.05	0.047
	M1	8	1.09 ± 0.09	
ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	17	0.69 ± 0.05	0.005
	IIa, IIb	22	0.99 ± 0.08	
	IIIa, IIIb, IIIC	32	0.92 ± 0.08	
	IV	8	1.09 ± 0.09	

Se observó, por tanto, una relación entre el ratio T/N y el estadio tumoral de estas muestras, según el cual el mayor grado de acortamiento se producía en los estadios más tempranos de la enfermedad (0.69 ± 0.05), y disminuía en estadios más avanzados (1.09 ± 0.09) ($p = 0.005$; Kruskal-Wallis) (**Figura 4.6**).

Figura 4.6
Grado de acortamiento de los telómeros de las muestras tumorales respecto a las muestras no tumorales (Ratio T/N) según el estadio tumoral (± 1 e.t.).



Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el acortamiento telomérico constituye un evento molecular que se produce durante las primeras etapas del desarrollo tumoral, y concuerdan con la hipótesis de que telómeros extremadamente cortos contribuyen al inicio de la tumorigénesis, a través de la generación de inestabilidad cromosómica (Cosme-Blanco y Chang, 2008).

Un estudio de comparación entre la longitud telomérica en tumores gástricos de diferentes estadios y de la mucosa gástrica normal, mostró una correlación positiva entre la disminución de la longitud telomérica y la edad de los pacientes afectados. Además, la longitud telomérica disminuía en los pacientes afectados de tumores en estadio I, y aumentaba progresivamente a medida que el estadio tumoral aumentaba, de igual forma que sucedía en nuestra población. Este trabajo también demostraba que los tumores gástricos con mayor grado de invasión, tenían longitudes teloméricas superiores a las longitudes de los tumores gástricos que no presentaban invasión en los ganglios linfáticos (Mu et al., 2012).

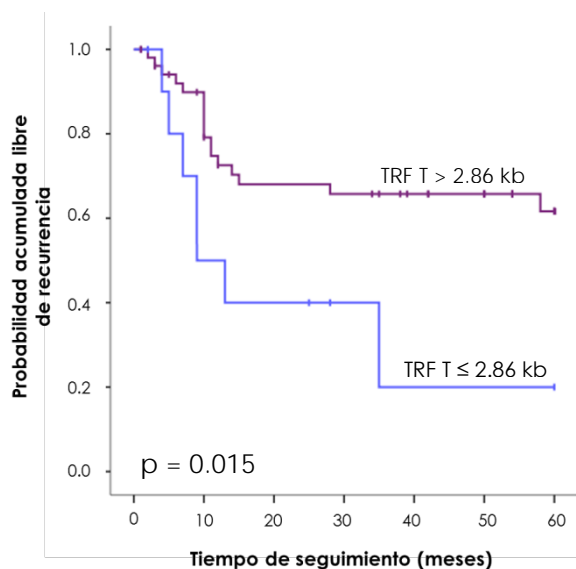
Cabe destacar en este apartado, la diferencia de longitud telomérica encontrada entre los dos tipos histológicos considerados. Los tumores gástricos de tipo intestinal mostraron una longitud telomérica inferior, y mayor grado de acortamiento que los tumores gástricos de tipo difuso. Diferencias de este tipo fueron también encontradas por el Dr. Zhang y col. entre adenocarcinomas gástricos diferenciados y pobremente diferenciados respecto a la longitud telomérica media de ambos tipos histológicos (Zhang et al., 1998).

4.2.1.4 ESTUDIO DE PRONÓSTICO EN CÁNCER GÁSTRICO EN RELACIÓN A LA LONGITUD TELOMÉRICA.

Con objeto de determinar el valor pronóstico que puede tener la longitud de los telómeros en los pacientes afectados de cáncer gástrico; realizamos un estudio de pronóstico según el método de Kaplan-Meier. Para ello, primero fue necesario establecer un punto de corte óptimo mediante el uso de la aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies et al., 2012). De esta forma se obtiene la longitud telomérica a la que se establecían las mayores diferencias con respecto al pronóstico clínico. El punto de corte óptimo se situó en 2.86 kb y, según este criterio, clasificamos la población total en dos subgrupos. De los 64 pacientes que cumplían las condiciones óptimas para ser incluidos en

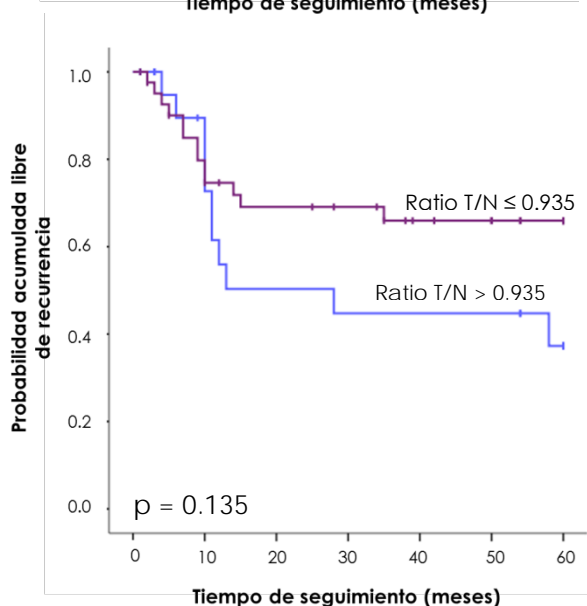
este tipo de ensayos, 53 (82.8%) mostraron una longitud telomérica tumoral superior a 2.86 kb, mientras que los 11 (17.2%) restantes presentaron una longitud telomérica tumoral inferior o igual a 2.86 kb.

Figura 4.7
Curvas de Kaplan-Meier según la longitud telomérica de las muestras tumorales (TRF T) en la población de pacientes con tumores gástricos.



El número de recidivas fue superior en el segundo grupo de pacientes, de los cuales 7 (63.6%) mostraron una recaída de la enfermedad durante el periodo de seguimiento, en comparación con los 17 (32.1%) pacientes con una longitud media del telómero tumoral superior a 2.86 kb, que también sufrieron recidiva de la enfermedad. La estimación del intervalo libre de enfermedad para los pacientes con telómeros tumorales más cortos fue de 23.70 ± 7.13 meses, frente a los 42.93 ± 3.47 meses del grupo de pacientes con telómeros tumorales de longitud superior. Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas ($p = 0.015$; Log-Rank), como se refleja en la **Figura 4.7**.

Figura 4.8
Curvas de Kaplan-Meier según el grado de acortamiento telomérico de las muestras tumorales respecto a las muestras control (Ratio T/N) en los pacientes afectados de cáncer gástrico.



Siguiendo este mismo criterio, realizamos un estudio pronóstico teniendo en cuenta el grado de acortamiento de los telómeros tumorales respecto a los telómeros del tejido no tumoral, en los pacientes afectados de cáncer gástrico (**Figura 4.8**). El punto de corte se situó en un valor del ratio T/N de 0.935, quedando clasificada la población en dos subgrupos, formados por 22 pacientes con un ratio T/N > 0.935, frente a 42 pacientes con un ratio T/N ≤ 0.935. Los pacientes con un grado de acortamiento inferior, mostraron una

estimación del intervalo libre de enfermedad de 33.09 ± 5.73 meses, con recidivas en el 50% de los casos; mientras que los pacientes con un grado de acortamiento telomérico más acusado presentaron una estimación del intervalo libre de enfermedad de 43.16 ± 3.86 meses, con recidivas en el 30.9% de los casos. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.135$; Log-Rank). Sin embargo, al comparar el ratio T/N de los dos grupos representados en la **Figura 4.7**, las diferencias resultaron significativas ($p < 0.001$). El ratio T/N del grupo de pacientes con TRF $T \leq 2.86$ kb fue de 0.53 ± 0.07 y el ratio T/N del grupo de pacientes con TRF $T > 2.86$ kb fue de 0.94 ± 0.05 .

Tal como se pudo observar en el posterior análisis multivariable de Cox que se llevó a cabo, los pacientes con tumores con telómeros de una longitud media inferior o igual a 2.86 kb, poseían un riesgo relativo (RR) de desarrollar recidiva de la enfermedad 4.017 veces superior que aquellos pacientes que presentaron tumores con telómeros de longitudes superiores. La longitud telomérica, por tanto, se comporta como un factor de pronóstico, independientemente del estadio tumoral considerado (**Tabla 4.6**).

	Riesgo relativo (RR)	Intervalo de confianza del 95%	p*
ESTADIO (I vs. II, III)	0.062	0.008 - 0.463	0.007
TRF T (≤ 2.86 kb vs. > 2.86 kb)	4.017	1.607 - 10.040	0.003

Tabla 4.6
Análisis de Cox correspondiente a la longitud telomérica de las muestras tumorales (TRF T) respecto al estadio tumoral, en la población de tumores gástricos.

La implicación de la función telomérica en el pronóstico de los pacientes afectados de cáncer ha sido objeto de estudio en diversos trabajos de investigación. Sin embargo, los resultados obtenidos al respecto son controvertidos, ya que dependen del tipo tumoral considerado (Mabruk y O'Flatharta, 2005; Bisoffi et al., 2006; Gancarcíková et al., 2010). Anteriores publicaciones de nuestro grupo de investigación demostraron asociaciones significativas de la longitud telomérica con el pronóstico clínico de pacientes afectados de cáncer colorrectal (Garcia-Aranda et al., 2006), y de cáncer de pulmón (Frías et al., 2008).

Un meta-análisis realizado en Dinamarca en la población general demostró que una menor longitud telomérica estaba relacionada con un peor pronóstico en aquellos indivi-

duos que padecieron un cáncer tras un seguimiento de 20 años, pero no con el riesgo de desarrollar un tumor (Weischer et al., 2013). Otros estudios realizados en pacientes afectados de cáncer colorrectal consideran, que un bajo grado de acortamiento telomérico en los tumores, es un factor asociado a mal pronóstico, de forma independiente al estadio tumoral (Gertler et al., 2004; Garcia-Aranda et al., 2006).

Estudios realizados en cáncer de mama, revelan el uso de la disfunción telomérica como un biomarcador de agresividad en tumores de mama hereditarios (Martinez-Delgado et al., 2013), o bien, muestran la relación existente entre el pronóstico y el estatus telomérico (Fordyce et al., 2006). Sin embargo, otras publicaciones en este mismo tipo tumoral no muestran relación entre la longitud telomérica y la evolución de la enfermedad (Odagiri et al., 1994; Lu et al., 2011). En el caso del cáncer de pulmón, un estudio de nuestro grupo de investigación determinó que la presencia de acortamiento telomérico en los tumores analizados estaba asociada a un peor pronóstico clínico de los pacientes (Frías et al., 2008). Por el contrario, un trabajo realizado por el Dr. Hsu, mostró que pacientes con un grado de acortamiento inferior al 25%, sufrían un peor pronóstico clínico tras el periodo de seguimiento (Hsu et al., 2004).

También se ha determinado el uso de la longitud telomérica como marcador de la progresión de la enfermedad y el pronóstico de los pacientes en otros tipos tumorales, como es el caso del cáncer de próstata, analizado en un estudio que describe la influencia del acortamiento telomérico en el pronóstico clínico desfavorable de los pacientes afectados (Heaphy et al., 2013), o de un estudio que describe la presencia de mayor longitud telomérica en pacientes con cáncer de cabeza y cuello que sufrían un peor desenlace (Patel et al., 2002), o de un estudio realizado en diferentes tipos de leucemias (Dewille et al., 2006).

En el estudio de pronóstico realizado en esta tesis, se muestra una asociación significativa entre la presencia de una longitud telomérica media tumoral inferior a 2.86 kb, con un peor pronóstico clínico para los pacientes con cáncer gástrico, evaluado como una mayor probabilidad de padecer una recidiva de la enfermedad. Además, se demuestra que la longitud telomérica puede considerarse un factor de pronóstico independiente del estadio tumoral. Sin embargo, los resultados con respecto al acortamiento

telomérico revelaron que aquellos pacientes que mostraban un mantenimiento de los telómeros en el tejido tumoral, con respecto al tejido utilizado como control, sufrían cierta tendencia hacia un peor desenlace, pero no de forma significativa. Como acabamos de ver, la asociación de la longitud telomérica con el pronóstico en otros tipos tumorales ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, no hemos encontrado estudios de pronóstico realizados en pacientes de cáncer gástrico. Por lo tanto, ampliar el conocimiento sobre el comportamiento de este factor en el desarrollo de la enfermedad supondrá un avance hacia el mejor tratamiento de los pacientes.

Aunque el uso clínico de la longitud telomérica como biomarcador tumoral no está completamente establecido, puede ayudar a la clasificación de los pacientes afectados de cáncer gástrico, proporcionar información muy útil sobre el pronóstico de los mismos, e incluso sugerir nuevas estrategias terapéuticas, dependiendo del estatus telomérico que presenten los pacientes.

4.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TUMORES GÁSTRICOS. RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMPACTO PRONÓSTICO.

4.2.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA.

Se procedió a analizar el nivel de actividad de la enzima telomerasa, como parte crucial de la función telomérica, debido a su papel en el mantenimiento de la longitud telomérica de las células tumorales.

La actividad telomerasa fue determinada en 85 casos procedentes de pacientes afectados de cáncer gástrico, tanto en las muestras de tejido tumoral como en las muestras de tejido control. El análisis se realizó de forma semi-cuantitativa, tras la elongación de las repeticiones teloméricas añadidas por telomerasa y su posterior detección por ELISA. Se encontró actividad de la enzima en 66 (77.6%) de los 85 tumores analizados. El 22.4% restante (19 muestras tumorales) no mostraron actividad.

Respecto a los niveles medidos en las muestras no tumorales, encontramos que un 63.3% presentó actividad telomerasa, siendo en todos los casos niveles de actividad en-

zimática inferiores a los determinados en sus correspondientes tejidos tumorales. El grado de actividad de la enzima teniendo en cuenta las muestras tumorales consideradas como positivas, se clasificó a su vez en tres niveles, bajo (niveles de absorbancia entre 0.2 – 0.8), medio (niveles de absorbancia entre 0.8 – 2), y alto (niveles de absorbancia ≥ 2). De esta forma, 49 tumores (74.3%) mostraron niveles de actividad enzimática bajos, mientras que niveles medios y altos de actividad fueron detectados en 15 y 2 de los tumores (22.7% y 3.0%), respectivamente.

En la mayoría de los tumores humanos, la reactivación de la enzima telomerasa es un evento fundamental para la progresión hacia un carcinoma, ya que contribuye al mantenimiento de la longitud telomérica de las células tumorales, permitiendo así su proliferación incontrolada. Aproximadamente, el 80% de los tumores humanos reactivan la telomerasa, y son numerosos los estudios que corroboran este dato en el caso del cáncer de estómago (Gao et al., 1999; Hiyama y Hiyama, 2002; Svinareva et al., 2010).

El análisis de la actividad telomerasa en las muestras de la mucosa gástrica normal, reveló la presencia de una mínima actividad enzimática, en todos los casos con valores inferiores a los de sus correspondientes tumores. La mucosa gástrica es una zona de continua regeneración celular, por lo que las células precisan de la reactivación de la telomerasa para evitar el acortamiento de los telómeros resultante de su elevada tasa de proliferación. En un estudio en el que se evaluó la expresión de *hTERT* en muestras no tumorales y tumorales de la mucosa gástrica, se obtuvo un porcentaje similar de activación de telomerasa en la mucosa control (Li et al., 2008). Este hecho no descarta totalmente el uso de la actividad telomerasa como marcador de la progresión tumoral, pero sí debe ser tenido en cuenta tanto para su determinación, como para el uso de terapias anti-telomerasa como tratamiento del cáncer gástrico.

4.2.2.2 RELACIÓN ENTRE LA LONGITUD TELOMÉRICA Y LA ACTIVIDAD TELOMERASA.

No se encontraron diferencias significativas entre la longitud telomérica media de las muestras tumorales con actividad enzimática positiva y negativa de telomerasa. La longitud telomérica media de los casos con actividad telomerasa negativa fue 5.86 ± 0.82 kb (media \pm error típico), y de 5.07 ± 0.27 kb en el caso de las muestras con actividad telo-

merasa positiva ($p = 0.560$; U de Mann-Whitney). Respecto al grado de acortamiento, las diferencias tampoco fueron significativas, siendo el ratio T/N, de los casos que no presentaron actividad telomerasa, superior al encontrado en los casos con actividad telomerasa positiva (1.04 ± 0.12 vs. 0.89 ± 0.04 , respectivamente; $p = 0.213$; U de Mann-Whitney). Por otro lado, se detectó una asociación negativa de carácter débil entre el grado de acortamiento en los tumores y el nivel de actividad telomerasa, con un coeficiente de correlación de $r = -0.265$. Esta correlación fue estadísticamente significativa ($p = 0.018$; Rho de Spearman).

Como se observa en el gráfico (**Figura 4.9**), el grado de acortamiento telomérico en los tumores es mayor a medida que el nivel de actividad telomerasa aumenta, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el valor medio del ratio T/N de los grupos establecidos, en función del grado de actividad de la enzima ($p = 0.194$; Kruskal-Wallis). Esta tendencia se observó también con respecto a la longitud telomérica media de las muestras tumorales ($r = -0.153$; $p = 0.174$; Rho de Spearman), pero tampoco se hallaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de actividad enzimática ($p = 0.542$; Kruskal-Wallis).

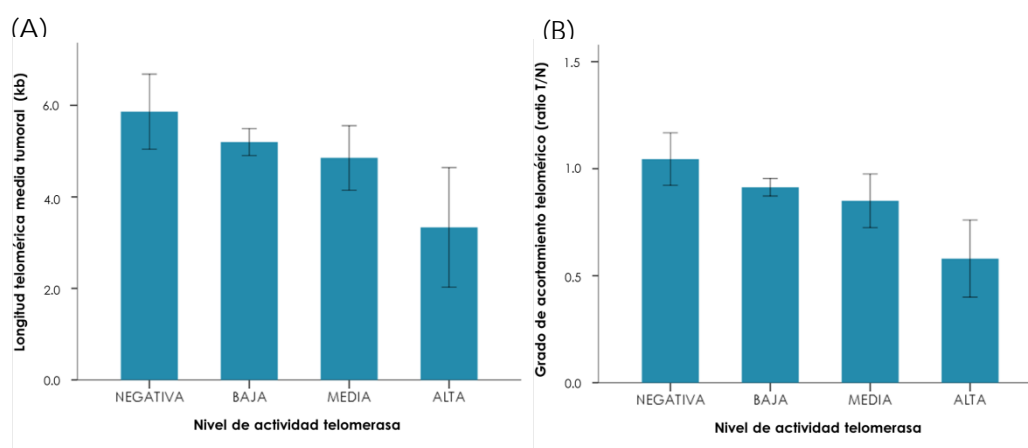


Figura 4.9
Nivel de actividad telomerasa en tumores gástricos y (A) la longitud media de los telómeros tumorales y (B) el grado de acortamiento de los telómeros tumorales respecto a las muestras control. (± 1 e.t.).

Por tanto, nuestros resultados no indican diferencias significativas en la longitud de los telómeros de los tumores gástricos investigados, con relación a la actividad de la telomerasa, pero sí se refleja una correlación entre ambas.

4.2.2.3 ACTIVIDAD TELOMERASA Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Se estudiaron, a continuación, las posibles asociaciones existentes entre la actividad telomerasa detectada en las muestras tumorales, y los parámetros clínico-patológicos disponibles. Estos resultados revelaron que no existe ningún tipo de asociación entre la presencia o no de actividad telomerasa y las variables evaluadas en cáncer gástrico, como se resume en la **Tabla 4.7**.

			Actividad telomerasa					
				Negativa		Positiva		
			Total	Nº casos (%)		Nº casos (%)		p*
Tabla 4.7 Correlaciones entre las distintas variables clínico- patológicas y la actividad telome- rasa en la pobla- ción de tumores gástricos. (* Chi- cuadrado).	SEXO	Varón	47	13	(27.7)	34	(72.3)	0.192
		Mujer	38	6	(15.8)	32	(84.2)	
	EDAD	≤ 73 años	44	9	(20.5)	35	(79.5)	0.820
		> 73 años	40	9	(22.5)	31	(77.5)	
	TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	27	6	(22.2)	21	(77.8)	0.869
		Intestinal	46	11	(23.9)	35	(76.1)	
	LOCALIZACIÓN	Proximal	13	3	(23.1)	10	(76.9)	0.844
		Distal, medio	63	13	(20.6)	50	(79.4)	
	TUMOR PRIMARIO (T)	T1, T2	27	5	(18.5)	22	(81.5)	0.543
		T3, T4	53	13	(24.5)	40	(75.5)	
	INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	31	6	(19.4)	25	(80.6)	0.592
		N1, N2, N3	49	12	(24.5)	37	(75.5)	
	METÁSTASIS (M)	M0	72	18	(25.0)	54	(75.0)	0.108
		M1	8	0	(0.0)	8	(100.0)	
	ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	18	4	(22.2)	14	(77.8)	0.265
		IIa, IIb	22	4	(18.2)	18	(81.8)	
IIIa, IIIb, IIIc		32	10	(31.3)	22	(68.8)		
IV		8	0	(0.0)	8	(100.0)		

Tabla 4.7
Correlaciones entre las distintas variables clínico-patológicas y la actividad telomerasa en la población de tumores gástricos. (* Chi-cuadrado).

Considerando solamente los tumores telomerasa positivos, se investigó el nivel de asociación entre las variables clínico-patológicas y los diferentes grados de actividad enzimática en los que clasificamos la población objeto de estudio. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, aunque sí una cierta tendencia en relación a la clasificación histológica de los tumores, así como respecto al tamaño del tumor primario, el grado de invasión ganglionar o el estadio tumoral (**Tabla 4.8**).

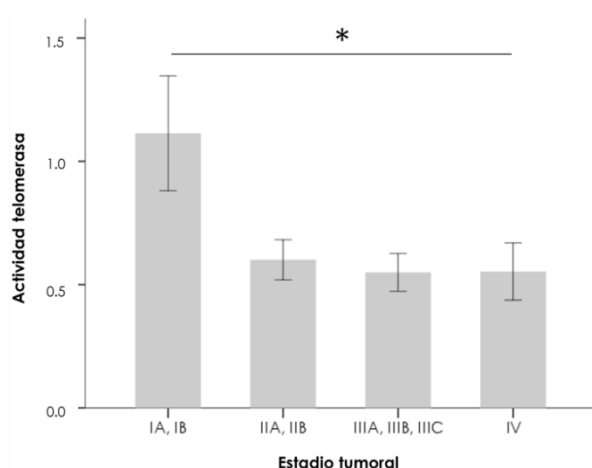
El 90.5% de los tumores gástricos de tipo difuso mostraron un nivel de actividad telomerasa bajo, con respecto al 65.7% en el caso de los tumores de tipo intestinal con este mismo nivel de actividad ($p = 0.062$; Chi-cuadrado). Teniendo en cuenta los parámetros relacionados con la clasificación TNM, se observó que 32 (71.1%) de las 45 muestras con niveles bajos de actividad telomerasa se correspondían con tumores clasificados como T3 y T4 ($p = 0.070$; Chi-cuadrado), y 30 de estos mismos pacientes (66.7%) mostraron invasión ganglionar positiva en el momento de la resección ($p = 0.085$; Chi-cuadrado). La relación establecida entre la presencia o no de actividad telomerasa, y de los distintos niveles de la misma con el resto de variables clínico-patológicas, no revelaron ningún tipo de asociación, por lo que no se pudieron extraer conclusiones.

			Actividad telomerasa						p*
			Baja		Media		Alta		
			Total	Nº casos (%)	Nº casos (%)	Nº casos (%)	Nº casos (%)	Nº casos (%)	
SEXO	Varón	34	24	(70.6)	8	(23.5)	2	(5.9)	0.363
	Mujer	32	25	(78.1)	7	(21.9)	0	(0.0)	
EDAD	≤ 73 años	35	26	(74.3)	8	(22.9)	1	(2.9)	0.996
	> 73 años	31	23	(74.2)	7	(22.6)	1	(3.2)	
TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	21	19	(90.5)	1	(4.8)	1	(4.8)	0.062
	Intestinal	35	23	(65.7)	11	(31.4)	1	(2.9)	
LOCALIZACIÓN	Proximal	10	6	(60.0)	3	(30.0)	1	(10.0)	0.347
	Distal, medio	50	38	(76.0)	11	(22.0)	1	(2.0)	
TUMOR PRIMARIO (T)	T1, T2	22	13	(59.1)	7	(31.8)	2	(9.1)	0.070
	T3, T4	40	32	(80.0)	8	(20.0)	0	(0.0)	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	25	15	(60.0)	8	(32.0)	2	(8.0)	0.085
	N1, N2, N3	37	30	(81.1)	7	(18.9)	0	(0.0)	
METÁSTASIS (M)	M0	54	38	(70.4)	14	(25.9)	2	(3.7)	0.578
	M1	8	7	(87.5)	1	(12.5)	0	(0.0)	
ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	14	6	(42.9)	6	(42.9)	2	(14.3)	0.063
	IIa, IIb	18	14	(77.8)	4	(22.2)	0	(0.0)	
	IIIa, IIIb, IIIc	22	18	(81.8)	4	(18.2)	0	(0.0)	
	IV	8	7	(87.5)	1	(12.5)	0	(0.0)	

Tabla 4.8
Correlaciones entre las distintas variables clínico-patológicas y el nivel de actividad telomerasa en la población de tumores gástricos telomerasa positivos. (*Chi-cuadrado).

Por último, realizamos un análisis de ANOVA para determinar con mayor precisión las diferencias existentes entre el nivel medio de actividad telomerasa que presentan las muestras en cada uno de los estadios definidos para el cáncer gástrico. De esta forma detectamos que los niveles más altos de actividad enzimática correspondían a tumores clasificados en estadios iniciales de la enfermedad, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.011$; ANOVA) (Figura 4.10).

Figura 4.10
Nivel de actividad telomerasa según el estadio tumoral en la población de tumores gástricos telomerasa positivos. (± 1 e.t.).



Tras el análisis de los resultados del estudio de la actividad telomerasa en los tumores gástricos considerados en esta tesis, podemos destacar que el 77.6% de los pacientes analizados tenían tumores con actividad telomerasa positiva, y que los niveles de actividad enzimática detec-

tados eran superiores en los tumores de estadio I. La activación de la telomerasa es un evento que ocurre en las primeras etapas del desarrollo de un carcinoma gástrico, posiblemente gracias a un aumento en la expresión del componente *hTERT* de telomerasa (Jong et al., 1999), compensando de esta manera, la rápida degradación telomérica que se produce al comienzo de la tumorigénesis, y confiriendo la inmortalidad a las células tumorales.

Algunos estudios demuestran una baja incidencia de actividad telomerasa en las lesiones precursoras a un tumor gástrico, como la metaplasia intestinal o el adenoma gástrico; sin embargo, el grado de incidencia aumenta hasta cerca del 90% cuando se trata de pacientes que ya han desarrollado un tumor maligno (Maruyama et al., 1997; Jong et al., 1999; Yang et al., 2001). Esto demuestra que la activación de la telomerasa es un mecanismo fundamental para la malignización de una lesión.

4.2.2.4 ESTUDIO DE PRONÓSTICO EN CÁNCER GÁSTRICO EN RELACIÓN A LA ACTIVIDAD TELOMERASA.

Posteriormente, se analizó si existía relación entre la actividad telomerasa y el pronóstico clínico de los pacientes afectados de cáncer gástrico. El análisis se realizó en la población seleccionada para los estudios de pronóstico, compuesta por 64 pacientes.

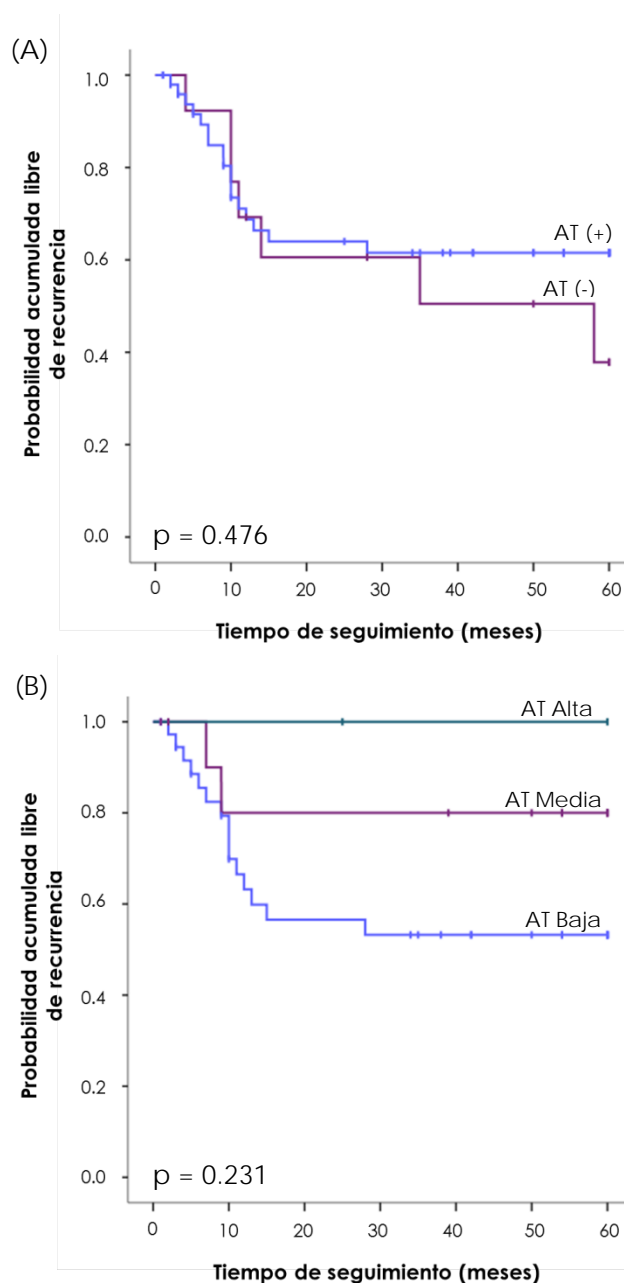
Del total de pacientes seleccionados, 13 (20.3%) presentaban tumores clasificados como telomerasa negativos, y 51 (79.7%) pacientes presentaban tumores con actividad telomerasa positiva. El intervalo libre de enfermedad fue ligeramente superior en los ca-

sos que mostraron positividad para telomerasa, siendo éste de 40.65 ± 3.73 meses, frente a los 37.47 ± 6.69 meses estimados en los casos que mostraron negatividad para telomerasa. Las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ($p = 0.476$; Log-Rank) (Figura 4.11 (A)).

Considerando únicamente el grupo de 51 casos con la enzima telomerasa activa, se realizó el mismo análisis distinguiendo tres grupos en función del nivel de actividad (Figura 4.11 (B)). En este caso, el intervalo libre de enfermedad de los pacientes con niveles bajos de actividad telomerasa fue de 36.59 ± 4.49 meses, inferior al intervalo libre de enfermedad en el grupo de pacientes que presentaron un nivel de actividad telomerasa medio, que fue de 49.60 ± 6.58 meses. En el caso de los tumores con una actividad telomerasa alta, no se obtuvo estimación del intervalo libre de enfermedad de los pacientes, ya que ninguno de los dos casos incluidos en este grupo presentó recaída de la enfermedad durante el periodo de seguimiento clínico. Las diferencias en el pronóstico de los pacientes con estos tres niveles de actividad telomerasa tampoco fueron significativas ($p = 0.231$; Log-Rank).

Figura 4.11

Estudio pronóstico en relación a la actividad telomerasa (AT). (A) Curvas de Kaplan-Meier respecto a la actividad telomerasa en la población total de pacientes afectados de tumores gástricos. (B) Curvas de Kaplan-Meier respecto al nivel de actividad telomerasa en los casos clasificados como telomerasa positivos.



En la bibliografía sobre el tema, existen estudios que valoran la utilidad clínica de la actividad telomerasa en el cáncer gástrico (Hiyama y Hiyama, 2002; Hu et al., 2009; Lü et al., 2012). Un meta-análisis de 18 estudios realizados en pacientes afectados de cáncer gástrico, reveló que además de jugar un papel en el inicio de la neoplasia, la presencia de altos niveles de actividad telomerasa promueve la invasión y la metástasis, lo que implicaría una posible utilidad de la actividad telomerasa como marcador de la progresión tumoral (Lü et al., 2012).

Un trabajo realizado por el Dr. Ahn describió que el pronóstico de pacientes con tumores gástricos telomerasa positivos era similar al de los pacientes con tumores telomerasa negativos (Ahn et al., 1997); mientras que un trabajo anterior había determinado que la supervivencia de los pacientes con tumores telomerasa positivos era significativamente inferior a la de los pacientes con tumores que no reactivaban la enzima (Hiyama et al., 1995).

En la población objeto de estudio de esta tesis no se apreciaron diferencias en el pronóstico de los pacientes con tumores de estómago con y sin actividad telomerasa. Tampoco se estableció una relación entre los niveles de actividad enzimática y el pronóstico clínico, considerando exclusivamente los casos telomerasa positivos. Serían necesarios, futuros estudios que aportaran más información sobre el papel de la telomerasa en el desarrollo del cáncer gástrico y su implicación en el pronóstico de la enfermedad.

4.3 FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TUMORES GÁSTRICOS CON INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES

Con el objetivo de conocer la implicación de la función telomérica en la vía carcinogénica del fenotipo mutador, se comparó la longitud de los telómeros y la actividad telomerasa entre los grupos obtenidos tras la clasificación según el grado de inestabilidad en microsatélites que presentaba la población de tumores gástricos investigada.

4.3.1 LONGITUD TELOMÉRICA EN TUMORES GÁSTRICOS CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

Se analizaron las diferencias existentes en la longitud telomérica de los tumores gástricos respecto a su grado de inestabilidad en microsatélites. La longitud telomérica media obtenida fue de 5.37 ± 0.32 kb (media \pm error típico), en el caso de los tumores que presentaban inestabilidad en una o ninguna de las secuencias microsatélite analizadas (MSI-L/MSS); y de 4.66 ± 0.54 kb en el caso de los tumores que presentaban un alto grado de inestabilidad en secuencias microsatélite (MSI-H). Por lo tanto, la longitud telomérica media obtenida fue inferior en el caso de los tumores con alto grado de inestabilidad; sin embargo, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ($p = 0.414$; U de Mann-Whitney) (Figura 4.12).

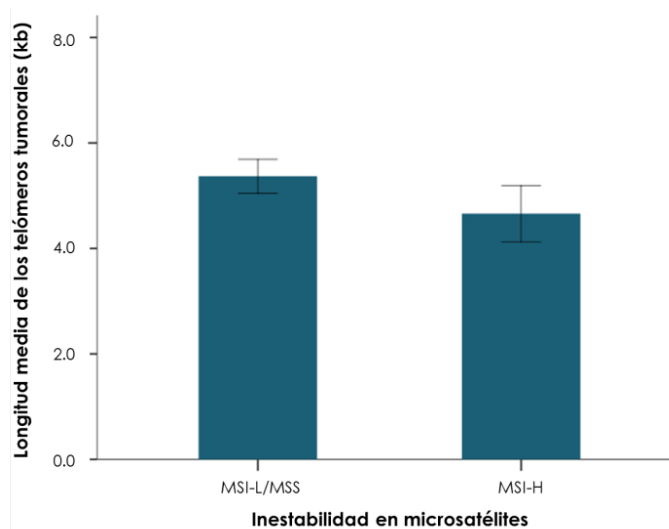
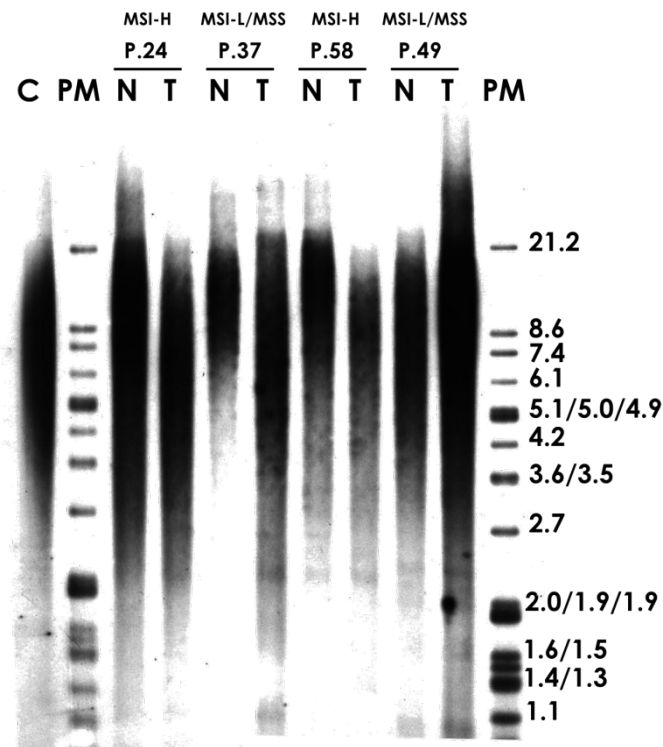


Figura 4.12
Longitud telomérica media de las muestras tumorales de cáncer gástrico clasificadas respecto a su inestabilidad en microsatélites. (± 1 e.t.)

Se observó también un mayor grado de acortamiento de los telómeros en aquellos tumores clasificados como MSI-H, siendo el valor medio del ratio T/N de 0.83 ± 0.09 ; en el grupo de los tumores clasificados como MSI-L/MSS, la media del ratio T/N fue de 0.94 ± 0.05 (Figura 4.13). En este caso, las diferencias entre ambos tampoco fueron significativas ($p = 0.189$; U de Mann-Whitney).

Figura 4.13
Southern-blot correspondiente a muestras no tumorales (N) y tumorales (T) de pacientes (P) afectados de cáncer gástrico. Los pacientes con tumores MSI-H (P.24 y P.58) muestran mayor grado de acortamiento telomérico que los pacientes con tumores MSI-L/MSS (P.37 y P.49).



En numerosos trabajos, se ha sugerido la existencia de una cierta asociación entre la maquinaria de reparación del ADN y los mecanismos de mantenimiento telomérico en los tumores colorrectales, en los que la presencia de alteraciones en el sistema MMR de reparación del daño en el ADN, participa en el desarrollo tumoral (Takagi et al., 2000; Rampazzo et al., 2010).

Como ya se ha descrito anteriormente, los genes implicados en los sistemas de reparación del ADN, como *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1* y *PMS2*, son cruciales para el mantenimiento de la integridad genómica y, por tanto, las mutaciones en estos genes favorecen la susceptibilidad para desarrollar tumores con alta inestabilidad en secuencias microsatélite. Recientemente, un estudio realizado en fibroblastos ha demostrado que una disminución de la expresión del gen *MSH2* provoca una aceleración en el acortamiento progresivo de los telómeros de estas células (Mendez-Bermudez y Royle, 2011). Esta situación es semejante a la que se estaría produciendo en los tumores MSI-H en los que observamos una mayor disminución de la longitud telomérica.

Por otro lado, un estudio anteriormente realizado en muestras de tumores gástricos, defiende que el acortamiento telomérico es un evento que se produce de forma totalmente independiente de la vía carcinogénica por la que se esté desarrollando el tumor (Fang et al., 2001). No olvidemos que el grado de proliferación de las células tumorales es elevado, y que el acortamiento telomérico es un fenómeno generalizado para todos los tipos tumorales. Por esta razón, no estaríamos observando diferencias significativas entre la longitud telomérica media tumoral de los tumores con y sin inestabilidad en microsatélites.

4.3.1.1 LONGITUD TELOMÉRICA Y SU IMPLICACIÓN EN EL PRONÓSTICO CLÍNICO DE TUMORES GÁSTRICOS CON INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

Como se ha expuesto en apartados anteriores de esta tesis, los estudios de pronóstico realizados en la población global de carcinomas gástricos revelaron que tanto la inestabilidad en microsatélites, como la longitud telomérica, son factores implicados en el diferente pronóstico clínico de los pacientes. Por esta razón, quisimos realizar un estudio en el que se relacionaran ambos factores moleculares, y se analizara conjuntamente su influencia en el pronóstico.

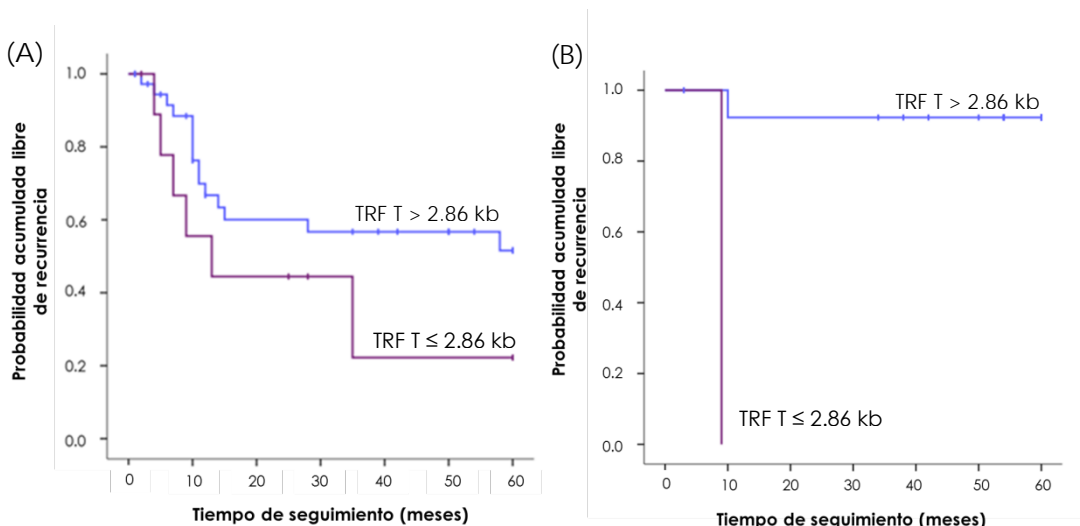
Se utilizó para este análisis el mismo grupo de pacientes que el utilizado en el estudio de pronóstico en relación a la inestabilidad en microsatélites. Este grupo estaba integrado por 63 pacientes, que cumplían los requisitos establecidos. La población se subdividió a su vez en varios grupos, teniendo en cuenta la longitud telomérica en la que se observaron las mayores diferencias en el pronóstico clínico de los pacientes. De estos 63 pacientes, 48 mostraban tumores MSI-L/MSS, de los cuales 38 presentaban una longitud telomérica tumoral (TRF T) superior a 2.86 kb, y 10 estaban afectados por tumores con una TRF T inferior o igual a 2.86 kb. De los 15 pacientes con tumores MSI-H, 14 fueron clasificados en el grupo TRF T superior a 2.86 kb, y solamente uno de los pacientes mostró una longitud telomérica inferior o igual a 2.86 kb.

Los resultados obtenidos revelaron que, dentro del pronóstico adverso que se asocia al grupo de pacientes con tumores MSI-L/MSS, el grupo con tumores de TRF T > 2.86 kb mostraban un mejor pronóstico clínico, ya que su intervalo libre de enfermedad fue de 38.68 ± 4.32 meses (media \pm error típico). El grupo de pacientes con tumores MSI-L/MSS

de longitud telomérica ≤ 2.86 kb mostró un intervalo libre de enfermedad de 25.33 ± 7.73 meses (**Figura 4.14 (A)**).

En el caso de los tumores con alta inestabilidad en microsatélites, la tendencia fue la misma, ya que el único caso que mostró una longitud telomérica inferior o igual a 2.86 kb presentó recidiva de la enfermedad tras nueve meses de seguimiento; mientras que el intervalo libre de enfermedad en el caso de los pacientes con tumores de longitudes teloméricas superiores a 2.86 kb, fue de 56.15 ± 3.69 meses (**Figura 4.14 (B)**). Las diferencias encontradas en este estudio fueron estadísticamente significativas con una $p = 0.047$ (Log-Rank).

Figura 4.14
Curvas de Kaplan-Meier en relación a la longitud telomérica tumoral (TRF T) en pacientes con tumores MSI-L/MSS (A) y pacientes con tumores MSI-H (B).



En el análisis de Kaplan-Meier obtuvimos que, independientemente de la vía carcinogénica por la que se desarrollaran los tumores gástricos, la presencia de telómeros tumorales de una longitud inferior a 2.86 kb implicaba una peor evolución clínica para los pacientes; incluso en el caso de que presentaran tumores de alta inestabilidad en microsatélites.

4.3.2 ACTIVIDAD TELOMERASA Y SU RELACIÓN CON LA INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

Teniendo en cuenta los niveles de actividad telomerasa medidos en la población total de tumores gástricos, se establecieron correlaciones entre este factor y la presencia de inestabilidad en microsatélites. El análisis reveló que el total de 15 muestras clasificadas

como tumores de alta inestabilidad en microsatélites, presentaba actividad positiva para la enzima. Sin embargo, de las 68 muestras que formaron parte del grupo de tumores de baja inestabilidad o estables en microsatélites, 49 (72.1%) mostraron actividad telomerasa positiva y 19 (27.9%) carecían de actividad telomerasa. Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas ($p = 0.020$; Chi-cuadrado), por lo que quisimos estudiar en profundidad que nivel de actividad telomerasa presentaban los tumores desarrollados por la vía del fenotipo mutador.

De los 15 tumores MSI-H, 9 (60%) mostraron un nivel de actividad bajo, 5 (33.3%) tenían un nivel de actividad telomerasa medio, y uno (6.7%) mostró un nivel alto de actividad enzimática. En el caso de los 49 tumores MSI-L/MSS con actividad telomerasa positiva, estos porcentajes fueron similares, ya que en 39 muestras (79.6%) se detectaron niveles bajos de actividad, 9 muestras (18.4%) presentaron niveles medios, y solamente una muestra (2.0%) mostró niveles altos de actividad ($p = 0.279$; Chi-cuadrado). En el caso de los tumores con alta inestabilidad en microsatélites, el nivel medio de actividad enzimática era de 0.86 ± 0.20 (media \pm error típico), más elevado que en caso de los tumores estables o con baja inestabilidad, que presentaban un valor medio de actividad de 0.46 ± 0.05 , con un nivel de significación de $p = 0.010$ (U de Mann-Whitney).

Los resultados observados en la población de tumores gástricos objeto de estudio se encuentran en concordancia con trabajos realizados en otros tipos tumorales en los que se ha demostrado la presencia de inestabilidad en microsatélites. Un estudio realizado exclusivamente en tumores colorrectales MSI-H, demuestra que la enzima telomerasa se encuentra fuertemente activa en este tipo de tumores (Takagi et al., 2000); y un trabajo similar realizado en tumores colorrectales esporádicos y endometriales con alta inestabilidad en microsatélites, defiende que la activación de la enzima telomerasa en este tipo de tumores es igualmente frecuente que en los tumores de baja o nula inestabilidad (Ibanez et al., 2004).

Sin embargo, existe la hipótesis de que los tumores con alteraciones en los sistemas de reparación del ADN utilizan mecanismos de mantenimiento telomérico alternativos a telomerasa, ya que la maquinaria de reparación MMR actúa impidiendo los fenómenos de recombinación. Por lo tanto, defectos en su funcionamiento promoverían la recombinación.

ción de las repeticiones teloméricas y anularían la necesidad de reactivación de la enzima telomerasa (Rizki y Lundblad, 2001; Bechter et al., 2004). Un estudio realizado en cánceres gástricos reveló la presencia de APBs en un porcentaje mayor de tumores MSI-H en comparación con los tumores MSI-L/MSS, así como una menor expresión de la subunidad catalítica de telomerasa (*hTERT*) en los tumores MSI-H (Njajou et al., 2010).

Nuestros resultados prueban que la enzima telomerasa se encuentra activada de forma elevada en todos los tumores que presentaron inestabilidad en microsatélites; sin embargo, sería necesario un estudio específico sobre la posible existencia de los mecanismos ALT en este tipo de tumores para descartar su implicación en la vía del fenotipo mutador.

4.3.2.1 ACTIVIDAD TELOMERASA Y SU IMPLICACIÓN EN EL PRONÓSTICO CLÍNICO DE TUMORES GÁSTRICOS CON INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

Con objeto de analizar si la actividad telomerasa podía influir en el distinto pronóstico clínico que presentan los pacientes de cáncer gástrico, afectados de tumores con alta inestabilidad en microsatélites, realizamos un análisis de Kaplan-Meier.

Primero se investigó el pronóstico clínico en función de la presencia o no de la actividad enzimática, en los pacientes con tumores con y sin inestabilidad en microsatélites (**Figura 4.15 (A, B)**). En el caso de los 48 pacientes con tumores de carácter estable o de baja inestabilidad, no hubo diferencias significativas en el pronóstico clínico cuando se consideró la actividad telomerasa. El intervalo libre de enfermedad estimado fue de 37.47 ± 6.69 meses en los 13 pacientes que presentaban tumores telomerasa negativos y de 35.84 ± 4.72 meses en los 35 pacientes con tumores telomerasa positivos.

En el caso de los pacientes afectados de tumores MSI-H, todos los casos presentaban actividad telomerasa positiva, y su intervalo libre de enfermedad fue de 52.79 ± 4.72 meses, el mismo que el obtenido para pacientes con tumores MSI-H sin tener en cuenta este factor. No se obtuvieron, por tanto, diferencias en el pronóstico clínico respecto a la presencia o no de actividad telomerasa ($p = 0.935$; Log-Rank).

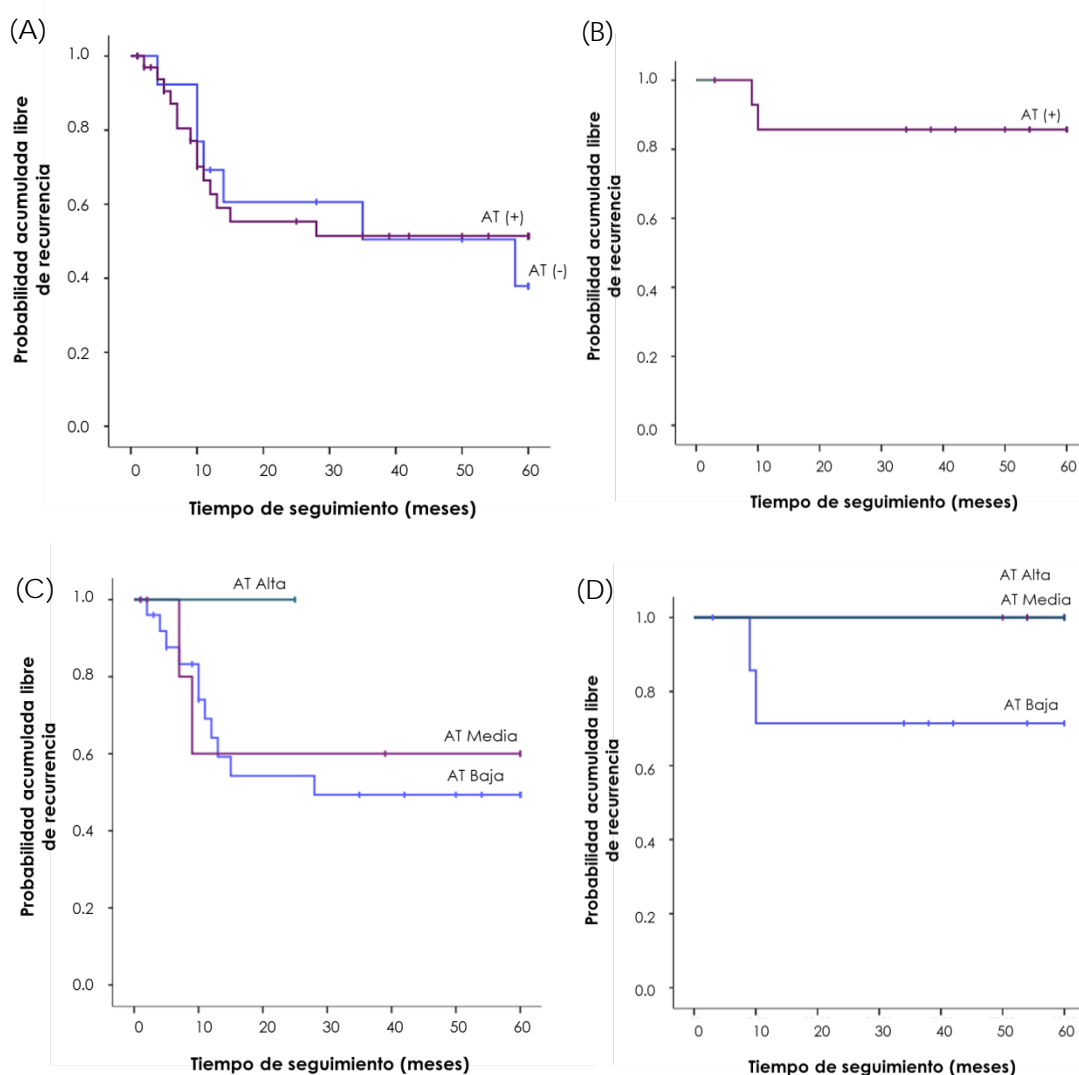


Figura 4.15
Curvas de Kaplan-Meier en función de la presencia (AT (+)) o no (AT (-)) de actividad telomerasa en pacientes con tumores MSI-L/MSS (A) y en la población de pacientes con tumores MSI-H (B). Las figuras (C) y (D) representan las curvas de Kaplan-Meier seleccionando la población telomerasa positiva, según el nivel de actividad enzimática de los pacientes con tumores MSI-L/MSS y tumores MSI-H respectivamente.

Seleccionando únicamente la población de casos telomerasa positivos, realizamos el mismo estudio teniendo en cuenta como factor el nivel de actividad de los tumores (**Figura 4.15 (C, D)**). De los 48 pacientes con tumores MSI-L/MSS, 27 casos presentaron niveles de actividad enzimática bajos, de los cuales 11 (42.3%), sufrieron recidivas durante el periodo de seguimiento, con un intervalo libre de enfermedad de 35.19 ± 5.38 meses. En el caso de los 7 pacientes con un nivel medio de actividad, sólo 2 (28.6%) recidivaron, y su intervalo libre de enfermedad fue de 39.20 ± 11.39 meses; sólo uno de los casos mostró niveles alto de actividad y no sufrió recaídas durante el periodo de seguimiento.

En el grupo de pacientes con tumores MSI-H, los únicos 2 casos que presentaron recidiva de la enfermedad presentaron niveles bajos de actividad enzimática. La significación estadística de este estudio fue $p = 0.493$ (Log-Rank), por lo tanto, tampoco se observó influencia del nivel de actividad telomerasa en el pronóstico clínico de los pacientes con tumores con alta inestabilidad en microsatélites.

4.4

FACTORES RELACIONADOS CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA

Seguidamente, considerando los resultados obtenidos sobre la influencia de la longitud telomérica en el diferente pronóstico clínico que presentan los pacientes afectados de cáncer gástrico, decidimos realizar un estudio de algunas de las principales moléculas asociadas a los telómeros. Por un lado, las proteínas TRF1 y TRF2 (*Telomere Repeat Binding Factors 1 and 2*) conocidas por su papel como reguladores negativos de la elongación telomérica, y por su función como conservadores de la integridad de las secuencias teloméricas (Smogorzewska et al., 2000). Por otro lado, TERRA (*Telomeric repeat – containing RNA*), molécula de ARN que se transcribe en la región subtelomérica y que permanece asociada al telómero como parte de la heterocromatina telomérica (Azzalin et al., 2007). Estos tres factores fueron analizados en nuestra población de pacientes afectados de tumores gástricos, investigando su posible relación con la vía del fenotipo mutador.

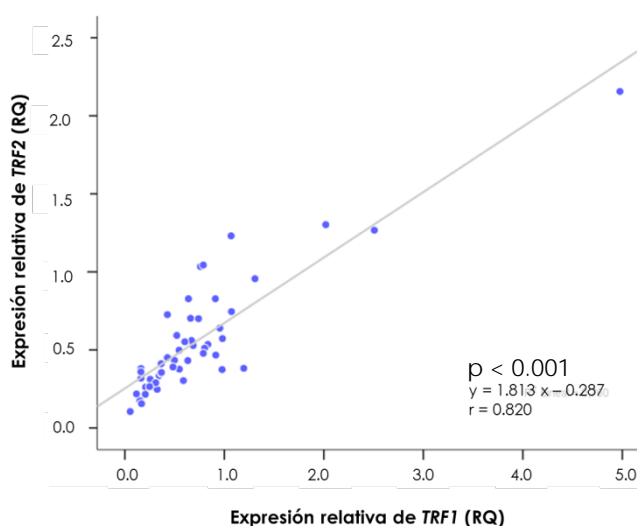
4.4.1 ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES DE UNIÓN A LAS REPETICIONES TELOMÉRICAS, *TRF1* Y *TRF2*.

Se llevó a cabo un estudio de expresión de los genes *TRF1* y *TRF2* en 50 de las 85 muestras que formaron parte de nuestra población. Los niveles de expresión génica se analizaron por PCR cuantitativa a tiempo real, mediante el uso de sondas *TaqMan*[®]. Se calculó el nivel de expresión de cada uno de estos genes en cada muestra tumoral, comparándolo con el valor de expresión de dicho gen en su correspondiente muestra de tejido no tumoral; ambos normalizados con la expresión del gen endógeno *GAPDH*, obteniendo así el valor de $\Delta\Delta Ct$.

Los tumores investigados presentaron menor nivel de expresión, tanto para *TRF1* como para *TRF2*, ya que sus valores de $\Delta\Delta Ct$ ³ fueron 0.97 ± 0.17 (media \pm error típico) y 1.10 ± 0.12 para *TRF1* y *TRF2*, respectivamente. Estos resultados revelaron diferencias respecto a la expresión en el tejido control ($\Delta\Delta Ct = 0$) de ambos genes, con un nivel de significación $p < 0.001$ (*t de Student*). A partir del $\Delta\Delta Ct$ se obtuvo el valor de RQ (*relative quantification*) definido como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este valor nos da una idea más clara del nivel de expresión relativa del gen objeto de estudio respecto a la muestra no tumoral, en cuyo caso el valor de RQ es igual a 1. Se consideró que valores de RQ comprendidos entre 0.5 y 2 se correspondían con niveles de expresión normales, mientras que valores de RQ inferiores a 0.5 o superiores a 2, son considerados como una disminución, o bien, un aumento en la expresión del gen en comparación a los niveles obtenidos en las muestras de tejido no tumoral.

El valor de RQ obtenido en las muestras tumorales fue 0.72 ± 0.11 para *TRF1* y de 0.55 ± 0.05 en el caso de *TRF2*. Ambos genes mostraron unos niveles de expresión significativamente inferiores a la expresión obtenida en el tejido control ($p < 0.001$; Wilcoxon), aunque dentro del rango considerado como normalidad. Además, como se puede observar en la **Figura 4.16**, los niveles de expresión de *TRF1* y los niveles de expresión de *TRF2* en las muestras tumorales se encontraban fuertemente correlacionados entre sí ($r = 0.820$; $p < 0.001$; Rho de Spearman).

Figura 4.16
Correlación
entre los niveles
de expresión
relativa (RQ) de
TRF1 y *TRF2* en
las muestras de
cáncer gástrico.



³ Tener en cuenta que menor valor de $\Delta\Delta Ct$ corresponde a un menor valor de Ct y, por tanto, mayor actividad transcripcional del gen objeto de estudio.

A continuación, nos propusimos estudiar el grado de asociación existente entre el nivel de expresión de ambos genes y la longitud telomérica tumoral, considerando el grado de acortamiento de los telómeros en los tumores. Para ello, realizamos un análisis de correlación. De los 50 casos en los que se analizó la expresión de *TRF1* y *TRF2*, se dispuso de la información referente a la longitud telomérica en 49 de ellos. Los resultados mostraron una asociación directa, y de carácter moderado, entre el nivel de expresión de *TRF1* y *TRF2* y el grado de acortamiento telomérico presente en las muestras tumorales analizadas. El coeficiente de correlación fue de $r = 0.308$ ($p = 0.031$; Rho de Spearman) para *TRF1* y de $r = 0.300$ ($p = 0.037$; Rho de Spearman) en el caso de *TRF2*. Esta asociación no fue significativa en ninguno de los dos casos con respecto a la longitud telomérica media tumoral ya que, en este caso, se obtuvieron unos coeficientes de correlación de $r = 0.113$ ($p = 0.442$; Rho de Spearman) y $r = 0.159$ ($p = 0.274$; Rho de Spearman) para *TRF1* y *TRF2*, respectivamente.

También realizamos una clasificación de la población de cánceres gástricos en función del ratio T/N, distribuyéndola por cuartiles. Comparamos el nivel de expresión relativa de *TRF1* y *TRF2* de cada uno de los grupos. El primer grupo incluyó los tumores con un ratio T/N < 0.70, el segundo grupo los cánceres que mostraron un ratio T/N comprendido entre 0.70 – 0.88, el tercer grupo los tumores con ratio T/N entre 0.8 – 1.09, y por último, los cánceres con un ratio T/N > 1.09. La prueba de Kruskal-Wallis dio como resultado niveles de significación de $p = 0.013$, y $p = 0.023$, para *TRF1* y *TRF2*, respectivamente. Como se observa en la **Figura 4.17**, el grado de acortamiento de los telómeros aumenta a medida que el nivel de expresión de ambos genes disminuye.

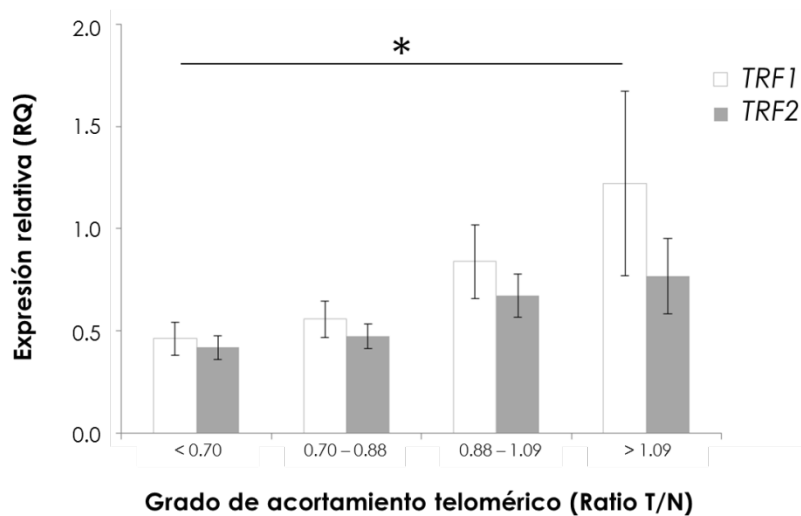


Figura 4.17
Niveles de expresión génica (RQ) de *TRF1* y *TRF2* según el grado de acortamiento telomérico de la población de tumores gástricos (distribuida por cuartiles) (± 1 e.t.).

La homeostasis telomérica es un proceso complejo en el que participan las proteínas que forman parte del complejo *shelterin*, la enzima telomerasa, y multitud de factores relacionados con los telómeros. TRF1 y TRF2 se unen directamente a la doble hebra del ADN telomérico, y participan en la regulación de su longitud, y en la protección de los extremos de los cromosomas (Smogorzewska et al., 2000). Durante la carcinogénesis, el mantenimiento de la estructura telomérica y su función depende de la interacción entre la longitud del telómero y las proteínas teloméricas.

Como se ha expuesto anteriormente, nuestros resultados muestran que el acortamiento telomérico es un proceso fundamental en las primeras etapas de la carcinogénesis gástrica, promoviendo la inestabilidad cromosómica y el desarrollo de un tumor. En etapas más avanzadas, la reactivación de la telomerasa o la puesta en marcha de mecanismos alternativos de mantenimiento telomérico, resulta en un mantenimiento de los telómeros. El estudio de expresión de los factores de unión al telómero *TRF1* y *TRF2* muestra que los niveles de ARN mensajero de ambos genes están disminuidos significativamente en los tumores gástricos, en relación a los tejidos no tumorales utilizados como control. Este resultado está en concordancia con estudios similares, en los que se observa una disminución significativa de los niveles de ARN mensajero de *TRF1*, *TRF2* y *TIN2*, tanto en tumores gástricos (Yamada et al., 2002), como en otros tipos tumorales, como el cáncer no microcítico de pulmón (Hu et al., 2006), y la leucemia linfocítica crónica tipo B (Poncet et al., 2008).

Existe cierta controversia respecto a los niveles de expresión de las proteínas *shelterins* en los tumores, por ejemplo, en cáncer gástrico, un trabajo asociaba mayores niveles de expresión de proteínas como TRF1, TRF2, TIN2, TERT, Ku70 y BRCA1, con el acortamiento telomérico determinado en lesiones precancerosas y tumores gástricos, demostrando su participación en las primeras etapas de la carcinogénesis (Hu et al., 2010). Estudios realizados en otros tipos tumorales, revelan mayor expresión de las proteínas TRF1 y TRF2 en cáncer de mama, en carcinoma hepatocelular y en cáncer de piel (no melanoma); mientras que en otros tipos tumorales, como el cáncer de esófago, no se encuentran diferencias en su expresión respecto al tejido no tumoral (Cookson y Laughton, 2009). Por lo tanto, no se puede definir un criterio universal para el comportamiento de estas moléculas en los tumores.

Posteriormente, se analizó el nivel de expresión de estos genes en las dos subpoblaciones de pacientes que mostraron diferencias en el pronóstico clínico, en función de la longitud telomérica tumoral. De los 49 pacientes considerados, 12 presentaron tumores gástricos con una longitud telomérica inferior o igual a 2.86 kb, frente a 37 pacientes que presentaron tumores con una longitud telomérica superior. Se observó una disminución en el nivel de expresión relativa (RQ) de *TRF1* y *TRF2* en el grupo de casos con TRF T ≤ 2.86 kb, situándose por debajo del nivel considerado como expresión normal en el caso de *TRF2* (RQ < 0.5). Sin embargo, las diferencias de expresión entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los genes (Tabla 4.9).

Tabla 4.9				
Análisis de expresión génica de <i>TRF1</i> y <i>TRF2</i> en tumores gástricos con una longitud telomérica tumoral (TRF T) ≤ 2.86 kb vs. > 2.86 kb. (* U de Mann-Whitney).				
	Estatus telomérico	Nº casos	Niveles de expresión (RQ ± e.t.)	p*
<i>TRF1</i>	TRF T ≤ 2.86 kb	12	0.53 ± 0.09	0.352
	TRF T > 2.86 kb	37	0.79 ± 0.14	
<i>TRF2</i>	TRF T ≤ 2.86 kb	12	0.45 ± 0.07	0.209
	TRF T > 2.86 kb	37	0.60 ± 0.06	

En cáncer gástrico, se ha sugerido que los tumores que presentan telómeros más cortos necesitan altos niveles de actividad telomerasa, y una gran cantidad de proteínas asociadas al ADN telomérico; mientras que aquellos tumores con telómeros de mayor longitud no requieren niveles elevados de actividad telomerasa ni de proteínas asociadas a telómeros (Matsutani et al., 2001). Nuestros resultados, sin embargo, no mostraron una relación significativa entre los niveles de expresión de *TRF1* y *TRF2*, y la longitud telomérica tumoral, aunque sí se observó una menor expresión de ambos genes en el grupo de pacientes con un peor pronóstico clínico, los cuales presentaban tumores con una longitud telomérica tumoral inferior a 2.86 kb. Así mismo, se obtuvieron menores niveles de expresión de ambos genes en aquellos tumores en los que el grado de acortamiento telomérico era más acusado.

Como ya hemos visto anteriormente, un excesivo acortamiento y la desprotección de los extremos de los cromosomas por defectos en el complejo *shelterin*, o por la disminución de la presencia de alguno de sus componentes, desencadenan una respuesta al daño en el ADN ya que los telómeros son reconocidos como roturas de la doble cadena.

La delección de *TRF1* en MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) provoca una rápida inducción de la senescencia, mediante la activación de las vías ATM/ATR por fosforilación, y activación de sus efectores *CHK1* y *CHK2*; sin embargo, las células seguían mostrando una longitud telomérica normal. Esto sugiere que *TRF1* no tiene una papel esencial en el mantenimiento de la longitud telomérica, pero si en su protección (Martínez et al., 2009; Sfeir et al., 2009). De la misma forma, otro estudio realizado en células carentes de *TRF1*, mostró que las células conservaban una longitud telomérica normal, pero existía un incremento de las fusiones entre los extremos de los cromosomas (Okamoto et al., 2008). Un trabajo similar, pero esta vez realizado en MEFs deficientes en *TRF2*, demuestra que la delección de este factor produce una inducción masiva de los mecanismos de recombinación homóloga. Esto se traduce en un incremento de la inestabilidad genómica, por fusiones entre cromosomas, relacionando así también a *TRF2* con una cierta función protectora de la integridad telomérica (Celli y Lange, 2005). Por lo tanto, la falta de expresión de *TRF1* y *TRF2* detectada en los tumores gástricos con mayor grado de acortamiento telomérico, podría estar provocando un mayor grado de inestabilidad genómica y, por tanto, el desarrollo de tumores de mayor agresividad que aquellos con telómeros no acortados.

Se relacionó también la actividad telomerasa determinada en la población de tumores gástricos con los niveles de expresión génica de *TRF1* y *TRF2*. De los 50 pacientes incluidos en los estudios de expresión, 41 tenían tumores con actividad telomerasa positiva y 9 tenían tumores con actividad telomerasa negativa. Los datos obtenidos indicaron que la expresión de *TRF1* y *TRF2* fue inferior en los tumores con actividad telomerasa positiva (0.67 ± 0.12 y 0.51 ± 0.05 para *TRF1* y *TRF2*, respectivamente), con respecto a los tumores con actividad telomerasa negativa. En éstos últimos, la expresión relativa, en el caso de *TRF1*, fue de 0.95 ± 0.21 , y en el caso de *TRF2*, de 0.76 ± 0.12 . Las diferencias fueron significativas en ambos casos ($p = 0.040$; U de Mann-Whitney).

Posteriormente, se analizó el grado de asociación entre los niveles de actividad telomerasa y el nivel de expresión relativa de *TRF1* y *TRF2* en las muestras tumorales. Los resultados mostraron la existencia de una correlación negativa entre los niveles de actividad telomerasa detectados en las muestras, y la expresión de ambos genes. Sin embargo, esta asociación fue de carácter débil, ya que se obtuvieron unos coeficientes de correla-

ción de $r = -0.283$ y de $r = -0.250$, respectivamente; pero sólo de forma significativa para *TRF1* ($p = 0.047$ para *TRF1*, $p = 0.080$ para *TRF2*; Rho de Spearman).

Nuestros resultados revelaron que en los tumores con actividad telomerasa positiva, los niveles de expresión de *TRF1* y *TRF2* eran inferiores a los niveles detectados en los tumores telomerasa negativos. Un estudio previo, que medía la expresión por inmunohistoquímica de TRF1 y TRF2, obtuvo mayores niveles de expresión de ambas proteínas en tejidos tumorales gástricos en los que previamente se había detectado actividad telomerasa. Esta expresión disminuía a medida que los tumores mostraban mayor grado de invasión, sugiriendo que las condiciones óptimas para una elongación eficiente de los telómeros, por parte de telomerasa, durante la progresión del cáncer gástrico, requería de la supresión de las proteínas asociadas al telómero (Miyachi et al., 2002).

Además, pusimos de manifiesto la existencia de una asociación negativa entre los niveles de actividad telomerasa y *TRF1*, corroborando su papel como regulador de la síntesis de repeticiones teloméricas por parte de telomerasa. TRF1 ejerce esta función a través de un mecanismo *feedback* negativo, mediante la unión de TRF1 al ADN telomérico e impidiendo el acceso de telomerasa al telómero (Steensel y Lange, 1997).

A continuación, analizamos la posible existencia de diferencias en el nivel de expresión relativa de los genes objeto de estudio y las variables clínico-patológicas en los tumores gástricos. No se encontró ningún tipo de asociación entre dichas variables y la expresión relativa de *TRF1* y *TRF2* detectada en las muestras de tejido tumoral (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10

Expresión génica (RQ) de *TRF1* y *TRF2* en las muestras tumorales de cáncer gástrico en relación a las variables clínico-patológicas. (* U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis).

			Niveles de expresión <i>TRF1</i>		Niveles de expresión <i>TRF2</i>		
			Nº casos	(RQ ± e.t.)	p*	(RQ ± e.t.)	p*
SEXO	Varón	22	0.60 ± 0.11	0.291		0.47 ± 0.06	0.159
	Mujer	28	0.81 ± 0.17			0.61 ± 0.08	
EDAD	≤ 73 años	26	0.60 ± 0.09	0.361		0.47 ± 0.05	0.103
	> 73 años	24	0.84 ± 0.20			0.65 ± 0.09	
TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	15	0.73 ± 0.12	0.408		0.53 ± 0.07	0.844
	Intestinal	27	0.78 ± 0.19			0.61 ± 0.08	
LOCALIZACIÓN	Proximal	5	0.60 ± 0.21	0.869		0.44 ± 0.14	0.345
	Distal, medio	38	0.72 ± 0.13			0.56 ± 0.06	
TUMOR PRIMARIO (T)	T1, T2	17	0.70 ± 0.13	0.444		0.59 ± 0.07	0.192
	T3, T4	31	0.72 ± 0.16			0.54 ± 0.07	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	23	0.58 ± 0.11	0.227		0.49 ± 0.06	0.348
	N1, N2, N3	25	0.84 ± 0.19			0.61 ± 0.09	
METÁSTASIS (M)	M0	46	0.72 ± 0.12	0.918		0.56 ± 0.06	0.796
	M1	2	0.59 ± 0.24			0.43 ± 0.10	
ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	14	0.83 ± 0.26	0.964		0.57 ± 0.08	0.864
	Ila, I Ib	13	1.18 ± 0.36			0.51 ± 0.26	
	IIla, II Ib, II Ic	19	0.98 ± 0.31			0.59 ± 0.11	
	IV	2	0.90 ± 0.64			0.43 ± 0.14	

4.4.1.1 EXPRESIÓN GÉNICA DE *TRF1* Y *TRF2* EN TUMORES GÁSTRICOS CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

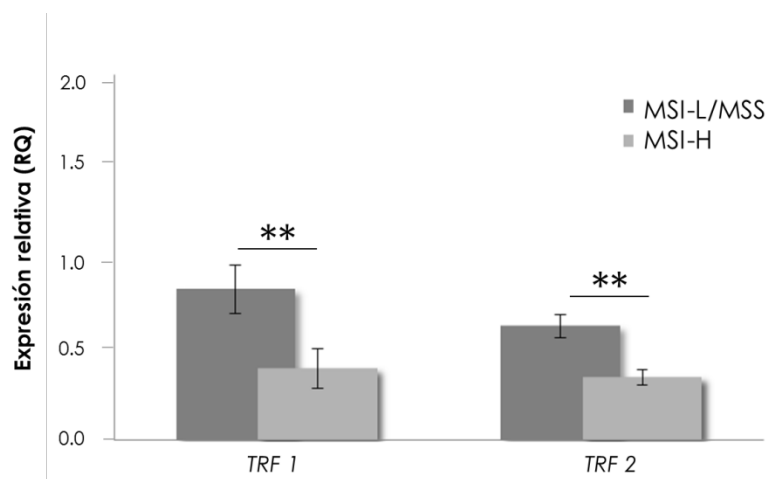
Se comparó el nivel de expresión de *TRF1* y *TRF2* en la población de tumores gástricos clasificada según su grado de inestabilidad en microsatélites. De los 50 casos que formaron parte del estudio de expresión, solamente se dispuso del grado de inestabilidad en 49 de ellos. Del total, 38 pacientes presentaron tumores de baja inestabilidad o estables (MSI-L/MSS), y 11 pacientes presentaron tumores de alta inestabilidad en microsatélites (MSI-H).

Tras el análisis de los resultados se observó, que el nivel de expresión de ambos genes, fue significativamente menor en el caso de los tumores con alta inestabilidad en microsatélites (MSI-H), respecto a los tumores con baja inestabilidad o estables (MSI-L/MSS), como se muestra en la **Figura 4.18**. Los valores medios de expresión relativa (RQ) obtenidos fueron de 0.39 ± 0.11 y 0.34 ± 0.04 (media ± error típico) en los tumores MSI-H, y 0.82 ± 0.13 y 0.62 ± 0.06 en los tumores clasificados como MSI-L/MSS (valores para *TRF1* y *TRF2*, respectivamente). Estos datos mostraron una disminución significativa de la expresión, tanto de *TRF1* como de *TRF2*, en el caso de los tumores con alta inestabilidad;

mientras que permanecieron dentro de los niveles normales en el caso de los tumores estables o con baja inestabilidad. Las diferencias entre ambos grupos mostraron un nivel de significación estadística de $p = 0.008$ en el caso de *TRF1* y de $p = 0.006$ para *TRF2* (U de Mann-Whitney).

Con el objeto de estudiar la influencia que TRF1 y TRF2 pudieran tener en la vía del fenotipo mutador, comprobamos si existían diferencias entre los niveles de expresión de ambos factores, entre los tumores gástricos con y sin presencia de inestabilidad en microsatélites. Nuestros resultados mostraron que los tumores gástricos desarrollados por la vía del fenotipo mutador (tumores MSI-H) poseían niveles de expresión de los genes *TRF1* y *TRF2*, significativamente inferiores que aquellos tumores desarrollados por la vía supresora (MSI-L/MSS).

Figura 4.18
Expresión génica (RQ) de *TRF1* y *TRF2* en tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites. (± 1 e.t.).



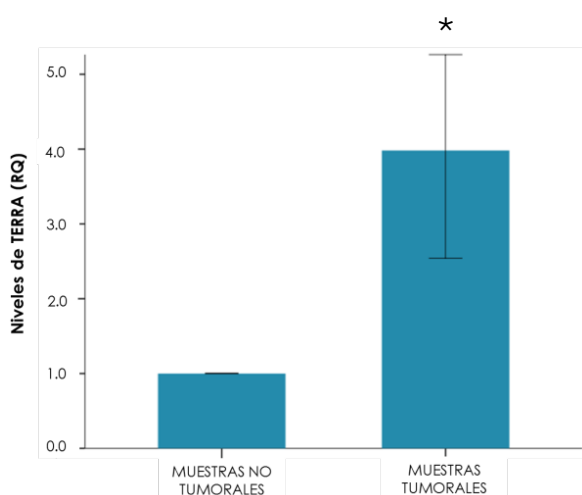
Como se ha mencionado anteriormente, una de las principales funciones establecidas tanto para TRF1 como para TRF2, es la de proteger los extremos teloméricos; su alteración genera telómeros disfuncionales característicos de las células tumorales. Sin embargo, estudios recientes defienden que TRF2 posee cierto papel oncogénico, ya que se ha detectado un incremento en su expresión en varios tipos de tumores durante la transformación maligna (Matsutani et al., 2001; Diala et al., 2013). Un estudio realizado en ratones ya defendía esta propuesta, demostrando que TRF2 actúa como un potente oncogén tras su sobre-expresión, provocando la inducción de la carcinogénesis epitelial, proceso que era más acelerado en ausencia de actividad telomerasa (Blanco et al., 2007). Otro trabajo relacionado sugiere que la pérdida de función de TRF2 disminuye la capacidad tumorigénica de varias líneas celulares humanas (Biroccio et al., 2006). Por lo tanto, nuestros resul-

tados parecen estar de acuerdo con esta corriente, ya que los pacientes con tumores gástricos MSI-L/MSS con mayores niveles de expresión de *TRF1* y *TRF2*, mostraban un peor pronóstico clínico; mientras que los pacientes con tumores MSI-H, con mejor pronóstico, presentaban una disminución en la expresión de *TRF1* y *TRF2*.

4.4.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE TERRA.

La cuantificación de los niveles de TERRA se realizó por PCR cuantitativa a tiempo real con *SYBR Green*[®], en las muestras no tumorales y tumorales de cáncer gástrico que formaron parte de la población de 50 pacientes seleccionados para los estudios de expresión. De esta forma, se obtuvo una cuantificación relativa (RQ) de la cantidad de ARN telomérico (TERRA) presente en cada muestra tumoral, en relación a la cantidad de ARN telomérico encontrada en su correspondiente muestra de tejido control.

Figura 4.19
Niveles de TERRA medidos en muestras no tumorales y tumorales de pacientes afectados de cáncer gástrico. (\pm 1 e.t.).



Los resultados indicaron un significativo aumento de los niveles de TERRA en las muestras tumorales (3.98 ± 1.44) (media \pm error típico), respecto a las muestras no tumorales ($RQ = 1$), siendo esta diferencia significativa, según la prueba de U de Mann-Whitney ($p = 0.043$) (Figura 4.19).

La presencia de moléculas de ARN no codificantes (TelRNA/TERRA) en los telómeros, se puso de manifiesto hace relativamente pocos años, por lo que los conocimientos sobre su función y su implicación en el cáncer aún son escasos. Se han realizado algunas investigaciones sobre la presencia de TERRA en líneas celulares tumorales humanas, como el estudio publicado por el Dr. Ng, realizado en varias líneas celulares tumorales de osteosarcoma y de pulmón. En este trabajo se describe la presencia de mayores niveles de TERRA en estas células, que los encontrados en la línea celular SV-40, procedente de fibroblastos humanos (Ng et al., 2009).

Sin embargo, son pocos los estudios que han determinado los niveles de TERRA en biopsias de tumores humanos. Solamente un trabajo realizado en pacientes afectados de astrocitomas, revela que los niveles de TERRA total en los tumores son inferiores a los de las muestras control, y van disminuyendo gradualmente a medida que el grado de malignidad de la enfermedad aumenta (Sampl et al., 2012). Por esta razón, resulta interesante la investigación de este nuevo factor en el cáncer gástrico. Nuestros resultados mostraron que los niveles de TERRA en las muestras tumorales se encontraban más elevados que en las muestras de la mucosa no tumoral, tomadas como referencia.

Con objeto de investigar el posible impacto que los niveles de TERRA ejercen sobre la longitud telomérica y la actividad telomerasa, realizamos un análisis comparativo entre estas dos variables. En primer lugar, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de TERRA y la longitud telomérica tumoral de las muestras seleccionadas. En este caso, no se encontró una asociación significativa entre ambas, ya que el coeficiente de correlación calculado fue de $r = -0.047$ ($p = 0.749$; Rho de Spearman).

Se comprobó también si existían diferencias en los niveles de TERRA entre los dos grupos con distinto pronóstico clínico, en relación a la longitud telomérica tumoral. De los 50 pacientes incluidos en este estudio, se dispuso de esta información para 49 de ellos. Los 12 pacientes con tumores con TRF $T \leq 2.86$ kb, mostraron un nivel medio de TERRA de 3.54 ± 1.74 (RQ), mientras que el grupo formado por 37 pacientes con tumores con TRF $T > 2.86$ kb mostraron mayor nivel de TERRA, siendo en este caso el valor medio de RQ de 4.22 ± 1.86 . Por tanto, la cantidad de moléculas de TERRA detectadas en este tipo de tumores fue más elevada, pero no de forma significativa ($p = 0.834$; U de Mann-Whitney).

Las diferencias en los niveles de TERRA entre los 41 tumores telomerasa positivos y los 9 tumores telomerasa negativos en los que se analizaron, fueron de 4.65 ± 1.74 y 0.93 ± 0.23 , respectivamente; sin embargo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p = 0.850$; U de Mann-Whitney). Un estudio de correlación entre los niveles de TERRA y los niveles de actividad telomerasa de estas muestras, tampoco demostró asociación alguna entre ambos factores ($r = 0.163$; $p = 0.257$; Rho de Spearman).

Una de las primeras funciones descritas para TERRA fue su actuación como regulador negativo de la longitud telomérica (Luke et al., 2008; Pfeiffer y Lingner, 2012), a través de su función como inhibidor directo de la telomerasa. Se trata de una inhibición de tipo competitivo con telomerasa, por su afinidad con el ADN telomérico, tal y como se describió en estudios realizados *in-vitro* (Redon et al., 2010). Sin embargo, esta propuesta ha sido muy discutida ya que, posteriormente, estudios realizados en células telomerasa positivas demostraron que la inducción de la transcripción en un telómero, no tenía efectos en la longitud del mismo (Farnung et al., 2012), ni afectaba a la capacidad de la telomerasa para alargar los telómeros transcritos (Arora et al., 2012).

Un trabajo anterior, realizado en levaduras, mostraba un acortamiento progresivo de los telómeros, de una manera cis-dependiente, tras la inducción de la transcripción telomérica (Sandell et al., 1994). El acortamiento que se produce en este caso es aditivo al que se produce de forma natural por inactivación de telomerasa; por lo tanto, el posible acortamiento debido a un aumento en los niveles de TERRA, sería independiente de la inhibición de telomerasa (Maicher et al., 2012).

Nuestros resultados no mostraron relaciones significativas entre los niveles de TERRA determinados y la longitud telomérica de las muestras tumorales. Tampoco se detectaron asociaciones entre niveles de TERRA y el grado de acortamiento telomérico de los tumores con respecto a las muestras control. Además, el grupo de pacientes con peor pronóstico clínico, que mostraba telómeros extremadamente cortos, presentaban menores niveles de TERRA que el grupo de pacientes con mejor pronóstico clínico, pero no de forma significativa. Así mismo, el estudio en relación a la actividad telomerasa mostraba mayor cantidad de moléculas de TERRA en los tumores telomerasa positivos, pero este aumento tampoco fue significativo. Por lo tanto, nuestros resultados estarían en concordancia con aquellos trabajos que defienden que TERRA no está relacionado con la longitud de los telómeros, ni con los niveles de actividad de la enzima telomerasa.

Respecto a las variables clínico-patológicas, no se encontraron relaciones de nivel estadístico entre éstas y los niveles de TERRA, excepto en el caso de los pacientes de edades más avanzadas, que mostraron mayores niveles de TERRA que aquellos pacientes con edades inferiores o iguales a 73 años ($p = 0.040$; U de Mann-Whitney) (Tabla 4.11).

			Niveles de TERRA		p*
			Nº casos	(RQ ± e.t.)	
SEXO	Varón	22	3.07 ± 1.06	0.123	
	Mujer	28	4.69 ± 2.44		
EDAD	≤ 73 años	26	1.19 ± 0.41	0.040	
	> 73 años	24	7.01 ± 2.86		
TIPO HISTOLÓGICO	Difuso	15	3.51 ± 2.04	0.265	
	Intestinal	27	2.41 ± 0.77		
LOCALIZACIÓN	Proximal	5	6.01 ± 3.81	0.840	
	Distal, medio	38	2.55 ± 0.86		
TUMOR PRIMARIO (T)	T1, T2	17	3.63 ± 1.37	0.755	
	T3, T4	31	4.33 ± 2.21		
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	N0	23	2.69 ± 1.00	0.893	
	N1, N2, N3	25	5.36 ± 2.72		
METÁSTASIS (M)	M0	46	4.23 ± 1.56	0.897	
	M1	2	0.57 ± 0.25		
ESTADIO TUMORAL	Ia, Ib	14	3.98 ± 1.62	0.878	
	IIa, IIb	13	6.20 ± 4.86		
	IIIa, IIIb, IIIc	19	3.08 ± 1.51		
	IV	2	0.57 ± 0.35		

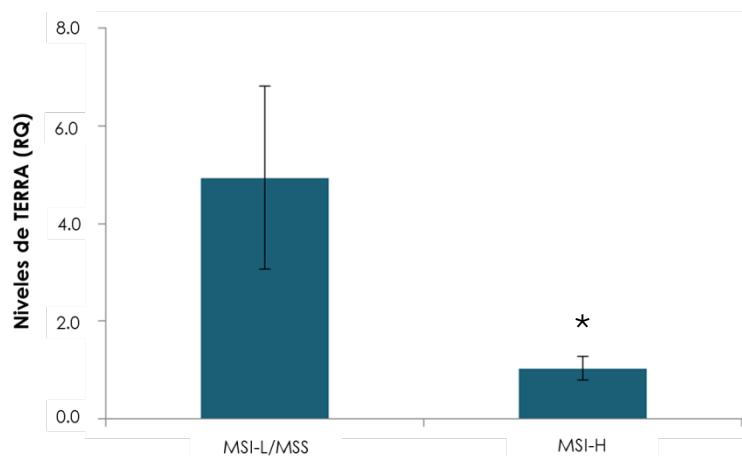
Tabla 4.11
Niveles de TERRA (RQ) en relación a las variables clínico-patológicas utilizadas en cáncer gástrico. (* U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis).

4.4.2.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE TERRA EN TUMORES GÁSTRICOS CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

La población de 50 pacientes utilizada en este estudio estaba formada por 38 pacientes con tumores de baja inestabilidad o estables (MSI-L/MSS) y 11 pacientes con tumores de alta inestabilidad en microsatélites (MSI-H). Los niveles de TERRA detectados en los tumores MSI-H fueron significativamente inferiores a los niveles detectados en los tumores MSI-L/MSS, como se refleja en la **Figura 4.20**.

Los niveles de TERRA determinado en las muestras MSI-H fueron de 1.04 ± 0.24 , mientras que para los tumores MSI-L/MSS fueron de 4.93 ± 1.87 . La diferencia entre ambos grupos fue significativa con un $p = 0.046$ (U de Mann-Whitney). Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de los niveles de TERRA en los tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites. Resulta interesante destacar que en este tipo tumoral con mayor grado de acortamiento telomérico, se observaran menores niveles de TERRA.

Figura 4.20
Cuantificación
relativa (RQ) de
TERRA en tumores
gástricos según su
grado de inestabi-
lidad en microsa-
télites. (* U de
Mann-Whitney)
(± 1 e.t.).



Las proteínas *shelterins* juegan también un papel importante en la transcripción de TERRA. Parece ser que TERRA es reclutado en los telómeros a través de su interacción física con TRF1 y TRF2, pero la delección de cada una de ellas ejerce efectos distintos en la transcripción de TERRA. Por un lado, la delección de *TRF1* produce una disminución de la transcripción de TERRA (Schoeftner y Blasco, 2008), mientras que la delección de *TRF2* provoca un aumento de la misma mediante la cooperación funcional entre p53 y MLL, un regulador transcripcional asociado a los telómeros (Caslini et al., 2009).

Sin embargo, en los tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites observamos bajos niveles de transcripción de TERRA. Una posible explicación podría encontrarse en la implicación del complejo MRE11 (MRE11/RAD50/NBS1) en la transcripción telomérica. Este complejo es requerido por los mecanismos de reparación del ADN, y participa en la regulación de los puntos de control del ciclo celular, y en el mantenimiento telomérico, llevando a la heterocromatina telomérica a un estado “abierto” que permite el acceso de telomerasa al telómero para su elongación (Ritchie y Petes, 2000).

Se ha descrito que los tumores gástricos con altos niveles de *TRF1* y *TRF2* requieren a su vez de altos niveles de expresión del complejo MRE11 (MRE11/RAD50/NBS1) para mantener la longitud telomérica, tal como correspondería a los tumores gástricos clasificados como MSI-L/MSS. Sin embargo, en el caso de los tumores MSI-H se ha descrito la presencia de mutaciones, que conllevan a una disminución de la expresión y funcionalidad del complejo MRE11, de forma que se estaría impidiendo la transcripción telomérica (Giannini et al., 2004; Ottini, 2004). En este caso, los telómeros se mantendrían en un es-

tado permanente de desprotección, que se traduciría en una activación permanente de las vías de respuesta al daño en el ADN, y la entrada en senescencia replicativa de las células.

4.5

DEGRADOMA TUMORAL EN CÁNCER GÁSTRICO

4.5.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEASAS IMPLICADAS EN CÁNCER GÁSTRICO.

Se realizó un estudio de expresión de un grupo de 31 genes codificantes para una serie de proteasas, relacionadas con el desarrollo y la progresión del cáncer, para conocer su implicación en el cáncer de estómago. Se seleccionó un grupo de 40 casos, en los que se analizaron los niveles de expresión de cada uno de los genes seleccionados, tanto en las muestras no tumorales como en los correspondientes tumores, mediante el empleo de matrices personalizadas *TaqMan® Array Micro Fluidic Cards* (Life Technologies, EE.UU.). De esta forma, se obtuvieron los niveles de expresión génica de cada una de las proteasas seleccionadas.

De los 31 genes estudiados, 16 presentaron un nivel de expresión relativa (RQ) dentro de los límites establecidos como normales (0.5 - 2), de los cuales, *ADAM9*, *ADAM10*, *ADAM15*, *ADAM23*, *MMP2*, *CASP1*, *CASP3*, *CTSD*, *ACE*, *SHH*, *HTRA-2* y *TIMP3* mostraron diferencias significativas entre las muestras tumorales y no tumorales. Los genes *ADAM12*, *ADAMTS18*, *MMP1*, *MMP3*, *MMP7*, *MMP9*, *MMP13*, *CASP5*, *CTSB*, *KLK6*, *KLK10*, *UCHL*, *SERPINE-1*, y *TIMP1* presentaron niveles de expresión (RQ) superiores a 2. Todos ellos se encontraban sobre-expresados de forma significativa en los tumores, con respecto a los niveles de expresión detectados en las muestras control, excepto *MMP1*, *CTSB* y *UCHL*, en los que las diferencias no alcanzaron el nivel de significación estadística. Solamente uno de los genes analizados mostró un nivel de expresión inferior a la normalidad, fue el caso de la proteasa *IHH* con un $RQ < 0.5$, pero muy cercano a este límite. Todos estos datos se encuentran detallados en la **Tabla 4.12**.

Niveles de expresión de proteasas

	($\Delta\Delta Ct \pm e.t.$)	p*	(RQ $\pm e.t.$)	p*
ADAM9	0.73 \pm 0.17	< 0.001	0.86 \pm 0.16	0.001
ADAM10	0.42 \pm 0.12	0.002	0.85 \pm 0.07	0.012
ADAM12	-1.68 \pm 0.27	< 0.001	6.24 \pm 1.56	< 0.001
ADAM15	0.72 \pm 0.16	< 0.001	0.79 \pm 0.11	0.048
ADAM23	1.55 \pm 0.36	< 0.001	0.93 \pm 0.24	0.004
ADAMTS18	-0.91 \pm 0.49	0.122	10.3 \pm 4.13	0.012
MMP1	0.80 \pm 0.41	0.079	5.98 \pm 1.96	0.985
MMP2	0.65 \pm 0.36	0.178	1.40 \pm 0.32	< 0.001
MMP3	-2.05 \pm 0.48	< 0.001	23.49 \pm 7.83	< 0.001
MMP7	-3.32 \pm 0.53	< 0.001	204.44 \pm 153.0	0.001
MMP9	-0.88 \pm 0.34	0.014	4.25 \pm 1.39	< 0.001
MMP13	-4.25 \pm 0.61	< 0.001	165.8 \pm 69.3	0.008
MMP14	-0.44 \pm 0.23	0.054	1.95 \pm 0.31	0.562
CASP1	0.33 \pm 0.20	0.1	1.11 \pm 0.18	< 0.001
CASP3	0.74 \pm 0.17	< 0.001	0.73 \pm 0.06	0.014
CASP5	-0.60 \pm 0.49	0.347	173.4 \pm 149.8	< 0.001
CTSB	-0.78 \pm 0.15	< 0.001	2.06 \pm 0.25	0.793
CTSD	0.14 \pm 0.17	0.411	1.12 \pm 0.14	0.005
CTSL	-0.50 \pm 0.21	0.036	1.99 \pm 0.33	0.251
KLK6	-7.03 \pm 0.63	< 0.001	1018.5 \pm 476.9	< 0.001
KLK10	-3.73 \pm 0.45	< 0.001	48.07 \pm 18.43	< 0.001
ACE	1.10 \pm 0.33	0.001	0.92 \pm 0.28	0.007
IHH	2.01 \pm 0.41	< 0.001	0.48 \pm 0.06	< 0.001
DHH	1.13 \pm 0.48	0.043	1.70 \pm 0.53	0.504
SHH	3.13 \pm 0.62	< 0.001	0.76 \pm 0.23	0.013
UCHL-1	0.82 \pm 0.42	0.073	2.27 \pm 0.91	0.722
HTRA-2	0.85 \pm 0.18	< 0.001	0.68 \pm 0.07	0.001
SERPINE1	-0.86 \pm 0.39	0.038	4.69 \pm 1.25	0.003
TIMP1	-1.15 \pm 0.23	< 0.001	3.26 \pm 0.59	< 0.001
TIMP2	0.71 \pm 0.26	0.019	1.07 \pm 0.18	0.528
TIMP3	1.20 \pm 0.29	< 0.001	0.97 \pm 0.29	0.011

Tabla 4.12

Expresión génica de las proteasas seleccionadas en un grupo de 40 pacientes afectados de cáncer gástrico. (* t de Student para valores de $\Delta\Delta Ct$, U de Mann-Whitney para valores de RQ).

A continuación, relacionamos la expresión génica relativa de cada una de las proteasas seleccionadas, con las variables clínico-patológicas consideradas en la población de cánceres gástricos objeto de estudio. No se encontró ninguna relación entre el sexo, la edad de los pacientes, la localización del tumor o el tipo histológico tumoral con la expresi-

sión génica de las distintas proteasas. En el caso de los parámetros relacionados con el desarrollo del tumor, cabe destacar que la expresión de los inhibidores de metaloproteasas *TIMP2* y *TIMP3*, se encontraba disminuida significativamente en los tumores clasificados como T1 y T2 frente a los clasificados como T3 y T4 (0.58 ± 0.11 vs. 1.26 ± 0.21 en el caso de *TIMP2*, y 0.33 ± 0.08 vs. 1.52 ± 0.48 en el caso de *TIMP3*; $p = 0.007$, $p = 0.021$, respectivamente; U de Mann Whitney); y ausencia de invasión ganglionar (N_0 vs. N_1 , N_2 , N_3) (0.65 ± 0.12 vs. 1.36 ± 0.25 , en el caso de *TIMP2* y 0.46 ± 0.08 vs. 1.69 ± 0.59 , en el caso de *TIMP3*; $p = 0.015$, $p = 0.050$ respectivamente; U de Mann Whitney).

Los resultados muestran que 14 de los 31 genes analizados presentaban niveles mayores de expresión en los tumores, con respecto a los tejidos no tumorales tomados como referencia. Este es el caso de algunas metaloproteasas, como MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, y MMP-13. La MMP-9 destaca por tener un papel fundamental en la invasión tumoral, y participa en la degradación del colágeno tipo IV, principal componente de la matriz extracelular (Emonard et al., 1992; Cao et al., 1995). Un estudio previo de nuestro grupo de investigación, realizado en pacientes afectados de cáncer colorrectal, demostró también un aumento de los niveles de MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2 en los tejidos tumorales con respecto a los tejidos control (Morán et al., 2005a), de igual forma que posteriormente se demostró en otro trabajo, que los niveles de estas mismas moléculas estaban aumentados también en los cánceres no microcíticos de pulmón (Inieta et al., 2007).

Un estudio de expresión génica de la metaloproteasa *MMP1* en cáncer gástrico, describe la relación entre niveles elevados de expresión y un peor pronóstico clínico de los pacientes, ya que participa en la invasión de la mucosa gástrica y en la diseminación de las células tumorales hacia los ganglios linfáticos. Además, participa en la activación de la MMP-2, también con una función importante en la invasión tumoral (Mori et al., 1997). Otra metaloproteasa implicada en los procesos de invasión y metástasis del cáncer gástrico es la MMP-7 (Honda et al., 1996; Ogden et al., 2008), cuyos niveles se han visto sobreexpresados en otros estudios similares realizados en diversos tipos de cáncer que afectan a órganos del tracto digestivo, como el esófago (Yamamoto et al., 1999a), el páncreas (Jones et al., 2004), el hígado (Yamamoto et al., 1997a) o el cáncer colorrectal (Adachi et al., 1999). En otros trabajos realizados en muestras de tumores gástricos, la MMP-7 se asocia con la invasión de la mucosa gástrica, la diseminación peritoneal y las metástasis a

ganglios linfáticos (Aihara et al., 2005). Esta sobre-expresión también ha sido identificada en lesiones de la mucosa gástrica, previas al desarrollo del tumor (Alakus et al., 2010). Respecto a la MMP-3, un estudio realizado *in vitro* en células AGS demuestra que la sobre-expresión de esta proteína causa un incremento en la capacidad de invasión de las células, además de incrementar la expresión de la MMP-10, y disminuir los niveles de la MMP-15 (Gencer et al., 2011).

En el caso de la colagenasa-3 (MMP-13), un estudio realizado en una serie de 110 adenocarcinomas gástricos demostró un aumento de expresión de esta metaloproteasa en los tejidos tumorales, y su contribución a la progresión del cáncer gástrico de forma coordinada con la sobre-expresión de MMP-1 y MMP-2 (Elnemr et al., 2003).

Las desintegrin-metaloproteasas *ADAM12* y *ADAMTS18* se encontraron también sobre-expresadas de forma significativa, de acuerdo con nuestros resultados, del mismo modo que fue publicado en un estudio realizado en varias líneas celulares de cáncer gástrico en las que se detectaron niveles elevados de ADAM-9, ADAM-12 y ADAM-15 por inmunohistoquímica (Carl-McGrath et al., 2005). Sin embargo, no se han encontrado en la literatura indicios de que CASP-5 tenga efectos significativos en la carcinogénesis gástrica, aunque sí se ha descrito la presencia de mutaciones en CASP-5 en un 16.7% de los tumores gástricos analizados, lo que provocaría la inhibición de la apoptosis y la progresión de la enfermedad (Soung et al., 2008).

Son varias las catepsinas cuyos niveles se han encontrado incrementados en cáncer gástrico, como la catepsina B, E, L, K, S, X y Z. En concordancia con nuestros resultados, la catepsina B se ha visto elevada en otros tipos de tumores de carácter muy invasivo, como el melanoma y, de forma más destacada, en aquellos casos en los que los pacientes habían desarrollado metástasis, sugiriendo un importante papel en la invasión tumoral (Tan et al., 2013).

Las dos kalikreínas analizadas, *KLK-6* y *KLK-10*, mostraron una expresión aberrante en los tumores gástricos de nuestra población. Varios son los estudios que corroboran este resultado, ya que en el caso de *KLK6*, su sobre-expresión ha sido relacionada con los procesos de carcinogénesis y progresión tumoral (Bayani y Diamandis, 2012). Otros trabajos

demuestran que su silenciamiento mediante ARNs de interferencia reduce el potencial de invasión de las células tumorales *in vitro*, su proliferación, y reduce la proporción de células en fase S del ciclo celular (Nagahara et al., 2005; Kim et al., 2012). Respecto a la *KLK-10* los resultados son más contradictorios, ya que se ha descrito una disminución de su expresión en algunos carcinomas gástricos pobremente diferenciados; posiblemente debido al silenciamiento por metilación de su promotor (Huang et al., 2007). Su sobre-expresión *in vitro*, también se ha descrito que produce un descenso del ratio de proliferación (Huang et al., 2008). Sin embargo, varios son los estudios que detectan altos niveles de *KLK10* en muestras de tejido tumoral gástrico (Yousef et al., 2005; Feng et al., 2006; Jiao et al., 2013).

4.5.2 EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEASAS EN TUMORES GÁSTRICOS CON Y SIN INESTABILIDAD EN MICROSATÉLITES.

Con objeto de explorar la posible existencia de un perfil de expresión génica diferente en los tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites, se realizó un estudio comparativo de los niveles de expresión de cada uno de los genes analizados en ambos grupos tumorales. De los 40 pacientes seleccionados para el estudio del degradoma, 29 presentaron tumores de baja inestabilidad o estables (MSI-L/MSS), y 11 pacientes presentaron tumores de alta inestabilidad (MSI-H).

Los resultados del análisis comparativo mostraron una disminución de la expresión en 28 (90.3%) de los 31 genes analizados en los tumores con alta inestabilidad en microsatélites, en comparación a los tumores de baja inestabilidad o estables. Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) para los genes *ADAM15*, *ADAM23*, *CASP3*, *DHH*, *SHH*, *HTRA-2*, y *TIMP2* (teniendo en cuenta valores de expresión tanto de $\Delta\Delta Ct$ como de RQ), como se muestra en la **Tabla 4.13**.

		Niveles de expresión de proteasas			
		($\Delta\Delta Ct \pm e.t.$)	p*	(RQ $\pm e.t.$)	p*
ADAM9	MSI-L/MSS	0.67 \pm 0.19	0.571	0.84 \pm 0.16	0.296
	MSI-H	0.89 \pm 0.40		0.92 \pm 0.43	
ADAM10	MSI-L/MSS	0.37 \pm 0.13	0.511	0.86 \pm 0.08	0.496
	MSI-H	0.55 \pm 0.27		0.82 \pm 0.16	
ADAM12	MSI-L/MSS	-1.48 \pm 0.34	0.249	5.95 \pm 2.02	0.256
	MSI-H	-2.20 \pm 0.42		7.01 \pm 2.15	
ADAM15	MSI-L/MSS	0.45 \pm 0.18	0.005	0.93 \pm 0.15	0.007
	MSI-H	1.43 \pm 0.25		0.45 \pm 0.08	
ADAM23	MSI-L/MSS	1.00 \pm 0.44	0.001	1.22 \pm 0.31	0.006
	MSI-H	2.99 \pm 0.33		0.16 \pm 0.03	
ADAMTS18	MSI-L/MSS	-1.24 \pm 0.57	0.167	12.45 \pm 5.04	0.162
	MSI-H	0.48 \pm 0.62		1.13 \pm 0.48	
MMP1	MSI-L/MSS	-0.79 \pm 0.50	0.968	6.71 \pm 2.38	0.809
	MSI-H	-0.84 \pm 0.57		2.82 \pm 1.43	
MMP2	MSI-L/MSS	0.56 \pm 0.44	0.351	1.60 \pm 0.39	0.267
	MSI-H	1.07 \pm 0.29		0.54 \pm 0.14	
MMP3	MSI-L/MSS	-2.62 \pm 0.56	0.055	29.87 \pm 10.50	0.126
	MSI-H	-0.55 \pm 0.84		6.64 \pm 3.93	
MMP7	MSI-L/MSS	-3.60 \pm 0.56	0.399	240.8 \pm 210.2	0.405
	MSI-H	-2.59 \pm 1.23		108.6 \pm 68.25	
MMP9	MSI-L/MSS	-0.76 \pm 0.39	0.444	4.35 \pm 1.69	0.385
	MSI-H	-1.43 \pm 0.55		3.80 \pm 1.36	
MMP13	MSI-L/MSS	-3.95 \pm 0.69	0.325	180.5 \pm 85.55	0.250
	MSI-H	-5.49 \pm 1.23		104.6 \pm 40.14	
MMP14	MSI-L/MSS	-0.48 \pm 0.27	0.761	2.07 \pm 0.37	0.595
	MSI-H	-0.29 \pm 0.33		1.40 \pm 0.33	
CASP1	MSI-L/MSS	0.26 \pm 0.24	0.240	1.21 \pm 0.21	0.311
	MSI-H	0.64 \pm 0.21		0.68 \pm 0.12	
CASP3	MSI-L/MSS	0.53 \pm 0.16	0.043	0.80 \pm 0.08	0.049
	MSI-H	1.29 \pm 0.41		0.53 \pm 0.09	
CASP5	MSI-L/MSS	-0.34 \pm 0.49	0.395	33.43 \pm 31.34	0.617
	MSI-H	-1.29 \pm 1.25		542.5 \pm 540.4	

Tabla 4.13
(continúa en la
página siguiente).

		Niveles de expresión de proteasas			
		($\Delta\Delta\text{Ct} \pm \text{e.t.}$)	p*	(RQ $\pm \text{e.t.}$)	p*
CTSB	MSI-L/MSS	-0.77 \pm 0.18	0.925	2.09 \pm 0.29	0.809
	MSI-H	-0.81 \pm 0.26		1.91 \pm 0.36	
CTSD	MSI-L/MSS	0.01 \pm 0.18	0.097	1.22 \pm 0.17	0.111
	MSI-H	0.72 \pm 0.29		0.67 \pm 0.13	
CTSL	MSI-L/MSS	-0.63 \pm 0.24	0.187	2.19 \pm 0.39	0.148
	MSI-H	0.10 \pm 0.42		1.12 \pm 0.27	
KLK6	MSI-L/MSS	-6.67 \pm 0.74	0.057	1127.2 \pm 585.80	0.227
	MSI-H	-8.58 \pm 0.58		547.5 \pm 182.7	
KLK10	MSI-L/MSS	-3.68 \pm 0.52	0.800	52.16 \pm 22.73	0.653
	MSI-H	-3.97 \pm 0.97		31.06 \pm 11.27	
ACE	MSI-L/MSS	1.00 \pm 0.39	0.503	1.03 \pm 0.33	0.209
	MSI-H	1.57 \pm 0.42		0.41 \pm 0.12	
IHH	MSI-L/MSS	1.60 \pm 0.37	0.035	0.54 \pm 0.07	0.067
	MSI-H	3.81 \pm 1.37		0.23 \pm 0.11	
DHH	MSI-L/MSS	0.70 \pm 0.55	0.005	2.08 \pm 0.64	0.023
	MSI-H	2.83 \pm 0.40		0.16 \pm 0.03	
SHH	MSI-L/MSS	1.94 \pm 0.66	0.001	1.03 \pm 0.28	< 0.001
	MSI-H	6.24 \pm 0.91		0.03 \pm 0.01	
UCHL-1	MSI-L/MSS	0.43 \pm 0.49	0.066	2.74 \pm 1.11	0.060
	MSI-H	2.47 \pm 0.60		0.26 \pm 0.09	
HTRA-2	MSI-L/MSS	0.62 \pm 0.15	0.006	0.74 \pm 0.08	0.034
	MSI-H	1.84 \pm 0.59		0.43 \pm 0.07	
SERPINE1	MSI-L/MSS	-0.98 \pm 0.47	0.336	5.42 \pm 1.51	0.311
	MSI-H	-0.36 \pm 0.41		1.56 \pm 0.41	
TIMP1	MSI-L/MSS	-1.26 \pm 0.27	0.354	3.61 \pm 0.70	0.247
	MSI-H	-0.70 \pm 0.29		1.78 \pm 0.28	
TIMP2	MSI-L/MSS	0.28 \pm 0.32	< 0.001	1.36 \pm 0.22	0.003
	MSI-H	1.87 \pm 0.25		0.31 \pm 0.04	
TIMP3	MSI-L/MSS	1.01 \pm 0.39	0.110	1.22 \pm 0.39	0.126
	MSI-H	1.72 \pm 0.17		0.32 \pm 0.03	

Tabla 4.13
(viene de la página anterior) Análisis de expresión génica diferencial de las proteasas seleccionadas en los tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites. (* \uparrow de Student para valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$, U de Mann-Whitney para valores de RQ).

Los resultados obtenidos en el estudio de *screening* preliminar fueron posteriormente validados por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR), mediante el empleo de sondas *TaqMan*[®]. Para ello, se amplió la población en nueve casos más de pacientes con tumores MSI-L/MSS, en los que se analizó el nivel de expresión de los genes que habían mostrado

diferencias significativas en el análisis anterior. Todos los pacientes con tumores MSI-H, de los que se dispuso de ARN para los estudios de expresión, ya habían sido incluidos en el primer grupo de pacientes.

Tabla 4.14
Análisis de expresión génica diferencial de las proteasas seleccionadas en los tumores gástricos con y sin inestabilidad en microsatélites tras la validación por Q-PCR (* t de Student para valores de $\Delta\Delta Ct$, U de Mann-Whitney para valores de RQ).

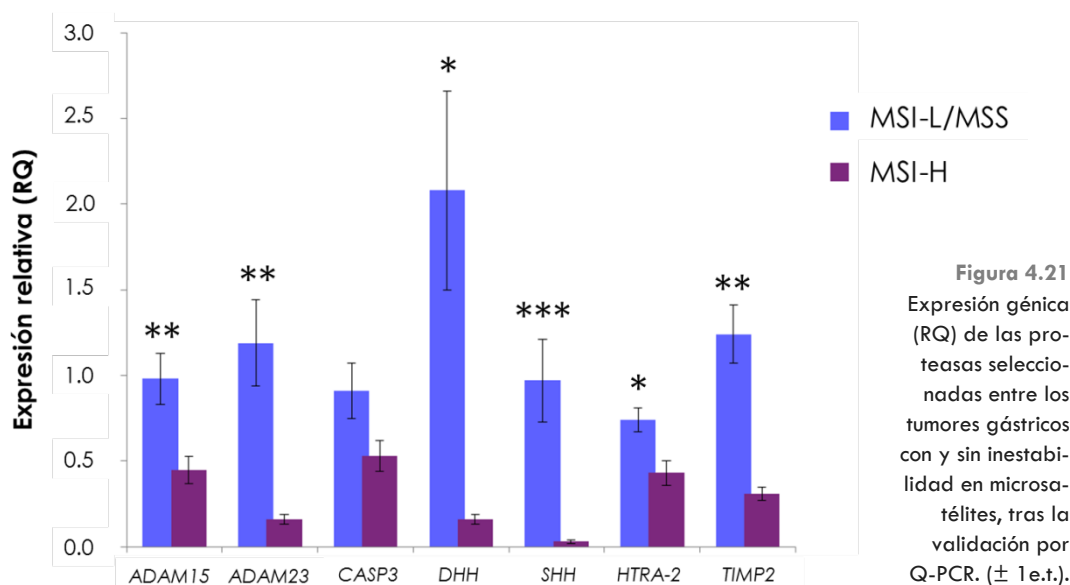
		Niveles de expresión de proteasas			
		($\Delta\Delta Ct \pm e.t.$)	p*	(RQ $\pm e.t.$)	p*
ADAM15	MSI-L/MSS	0.36 \pm 0.16	0.002	0.98 \pm 0.15	0.003
	MSI-H	1.43 \pm 0.25		0.45 \pm 0.08	
ADAM23	MSI-L/MSS	1.01 \pm 0.38	< 0.001	1.19 \pm 0.25	0.003
	MSI-H	3.00 \pm 0.33		0.16 \pm 0.03	
CASP3	MSI-L/MSS	0.50 \pm 0.16	0.037	0.91 \pm 0.16	0.080
	MSI-H	1.29 \pm 0.41		0.53 \pm 0.09	
DHH	MSI-L/MSS	0.67 \pm 0.54	0.005	2.05 \pm 0.58	0.023
	MSI-H	2.83 \pm 0.40		0.16 \pm 0.03	
SHH	MSI-L/MSS	1.70 \pm 0.53	< 0.001	0.97 \pm 0.24	< 0.001
	MSI-H	6.24 \pm 0.91		0.03 \pm 0.01	
HTRA-2	MSI-L/MSS	0.63 \pm 0.11	0.006	0.75 \pm 0.07	0.034
	MSI-H	1.84 \pm 0.59		0.43 \pm 0.07	
TIMP2	MSI-L/MSS	0.34 \pm 0.26	< 0.001	1.24 \pm 0.17	0.002
	MSI-H	1.87 \pm 0.25		0.31 \pm 0.04	

Al comparar los datos de expresión obtenidos en los tumores con y sin inestabilidad en microsatélites, tras el aumento de la población y su análisis por PCR cuantitativa a tiempo real, se constató la disminución significativa de la expresión de *ADAM15*, *ADAM23*, *DHH*, *SHH*, *HTRA-2* y *TIMP2* ($p = 0.003$, $p = 0.003$, $p = 0.023$, $p < 0.001$, $p = 0.034$, $p = 0.002$, respectivamente; U de Mann-Whitney). En el caso de *CASP3*, las diferencias de expresión entre ambos grupos no alcanzaron el nivel de significación para los valores de RQ ($p = 0.080$; U de Mann-Whitney), aunque sí se mantuvo la misma tendencia que en el anterior análisis (Tabla 4.14, Figura 4.21).

La presencia de metástasis es la principal causa de muerte entre los pacientes con cáncer. Es un proceso cuyo paso inicial se considera la invasión del tejido circundante al tumor por las células cancerígenas. En el caso de los tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites, la presencia de metástasis en los pacientes es muy reducida en comparación con los tumores que no presentan este tipo de alteraciones, lo que nos hizo

pensar que ambos tipos tumorales podrían presentar un perfil de expresión diferente de las proteínas implicadas en el proceso metastásico y en la progresión tumoral.

Tras el análisis comparativo entre los niveles de expresión de las proteasas analizadas, respecto a la presencia o no de inestabilidad en microsatélites en los tumores, los resultados mostraron una disminución de la expresión, de forma generalizada, de todos los genes considerados, siendo significativa en el caso de *ADAM15*, *ADAM23*, *DHH*, *SHH*, *HTRA-2* y el inhibidor de metaloproteasas, *TIMP2*.



Nuestro grupo de investigación ya había descrito previamente diferencias moleculares en algunas proteasas, entre tumores colorrectales con y sin inestabilidad en microsatélites. Es el caso de la MMP-3, cuya expresión se ve disminuida en tumores MSI-H debido a mutaciones en el promotor que no aparecen en los tumores MSI-L/MSS (Morán et al., 2002; 2005b). Un estudio similar se realizó también para la MMP-7, cuya expresión se vio significativamente disminuida tras un *screening* de 114 moléculas implicadas en adhesión, en una serie de tumores colorrectales con y sin inestabilidad en microsatélites (Ortega et al., 2010). En el caso del cáncer gástrico, nuestros resultados demuestran que en los tumores con alta inestabilidad la expresión de las moléculas de adhesión que participan en los procesos de invasión y metástasis del cáncer se encuentra disminuida, favoreciendo así el mejor pronóstico clínico característico de este grupo de tumores.

Una de las principales características de los tumores desarrollados por la vía del fenotipo mutador es el alto porcentaje de mutaciones acumuladas. La mayoría de ellas son producidas en regiones microsatélite denominadas “neutras” o “no codificantes”. Sin embargo, también se crean alteraciones en genes implicados en el desarrollo del cáncer, ya que muchas de las regiones codificantes de los genes comienzan con secuencias repetitivas, *loci* característicos de los microsatélites (Yamamoto et al., 1997b). En este caso, la replicación fiel del material genético incluido en estas regiones inestables se ve comprometida por fallos en los sistemas de reparación del ADN, acumulándose las mutaciones de genes implicados en la carcinogénesis. Este concepto se encuentra en concordancia con el modelo propuesto por el Dr. Perucho en 1996, conocido como “el mutador que muta a otro mutador” (Perucho, 1996).

Son varios los genes que resultan con una expresión disminuida debido a la presencia de este tipo de mutaciones en sus regiones promotoras. Este es el caso de la *CASP-5*, que posee una región (A)₁₀ en su región codificante; detectándose mutaciones en un 28% de los tumores de endometrio, un 62% de los tumores de colon, y un 44% de los tumores de estómago con inestabilidad en microsatélites. Un hecho similar ocurre en los genes de los sistemas MMR (*mismatch repair system*), *hMSH3* y *hMSH6*, cuyas mutaciones son detectadas en un 64% y un 52%, respectivamente, en tumores gástricos MSI-H (Schwartz et al., 1999).

Otra posible explicación para la disminución de los niveles de expresión de algunas de estas proteasas, y que ha sido relacionado con la presencia de inestabilidad en microsatélites, es su regulación por hipermetilación de sus regiones promotoras, lo que provoca el silenciamiento génico de las mismas. Este mecanismo ha sido descrito con anterioridad en el caso de *ADAM23*, cuya expresión se encuentra reducida en los tumores gástricos, y que se ve aumentada tras el tratamiento con un agente desmetilante (Takada et al., 2005). También ha sido descrita la presencia, de forma frecuente, de un alto grado de metilación del promotor del gen *IHH* en tumores y adenomas colorrectales (Fu et al., 2010a; 2010b). Otro estudio realizado también en tumores colorrectales revela la frecuente presencia de mutaciones de marco de lectura y metilación del promotor del gen *TIMP3*, en tumores con alta inestabilidad en microsatélites (Brueckl et al., 2005).

4.6 DISCUSIÓN FINAL

El cáncer es una de las mayores causas de muerte en todo el mundo. Entre los tipos de tumores más agresivos se encuentra el cáncer gástrico, quinto tipo tumoral con mayor incidencia a nivel mundial, y el tercer principal causante de muertes por cáncer (Ferlay et al., 2014). Su índice de supervivencia a 5 años es de, aproximadamente, un 25%, lo que nos indica la necesidad de investigar nuevos tratamientos que ayuden a mejorar estas cifras. Para ello, resulta fundamental el conocimiento en profundidad de la enfermedad y de sus características moleculares, con el objetivo de lograr una mejor clasificación de los pacientes en el momento del diagnóstico, y la elección de la terapia adecuada. Además, la descripción de nuevos biomarcadores permitirá establecer nuevas estrategias de tratamiento, cada vez más personalizadas y adecuadas al tipo de tumor a tratar.

El cáncer de estómago es considerado una enfermedad multifactorial, ya que es el resultado de la combinación de una serie de factores ambientales, hereditarios, y alteraciones genéticas específicas. A nivel molecular, las vías carcinogénicas implicadas en el desarrollo del cáncer gástrico, la vía supresora, y la vía del fenotipo mutador, dan lugar al desarrollo de tumores con distintas características clínico-patológicas, que confieren un pronóstico clínico diferente a los pacientes afectados. Profundizar en el perfil molecular que sustenta estas diferencias nos ayudará a definir nuevos marcadores específicos para cada tipo tumoral, con un claro potencial terapéutico.

En nuestra población, detectamos claramente una subpoblación de tumores gástricos desarrollados por la vía del fenotipo mutador, que se correspondía con el 18.1% de la población total. Se trata de tumores que mostraron un perfil clínico-patológico específico, ya que se correspondían con cánceres gástricos de tipo intestinal, y de localización distal, en definitiva, tumores con características menos agresivas que las que desarrollan en otros tipos de cánceres gástricos. Además, los pacientes clasificados en este grupo, no presentaban invasión ganglionar, ni metástasis en el momento de la intervención.

El mejor pronóstico clínico desarrollado por los pacientes con tumores que presentan inestabilidad en microsatélites, es un hecho confirmado; sin embargo, poco se conoce del mecanismo que soporta este proceso. Multitud de estudios demuestran que la presencia de este tipo de alteraciones confiere a los pacientes una mayor probabilidad de supervivencia (Falchetti et al., 2008; Corso et al., 2009; Kim et al., 2010; Fang et al., 2012).

En nuestra población, también se demostró que los pacientes con tumores que presentaban alta inestabilidad en microsatélites mostraban un mejor pronóstico clínico que el grupo de pacientes con tumores de baja inestabilidad en microsatélites o estables. La detección molecular de la inestabilidad en microsatélites es relativamente simple, en comparación con la mayoría de las características genéticas moleculares con un potencial valor clínico, y debería ser parte integral de la rutina de clasificación del cáncer de estómago, con el fin de proporcionar a los pacientes un pronóstico más exacto, y un tratamiento adecuado a su situación.

Por otro lado, la inestabilidad genómica generada en las células, debido al acortamiento crítico de los telómeros, es una de las principales causas del desarrollo de un tumor (Murnane, 2010). Las células tumorales tienen la capacidad de sortear las señales que promueven la parada del ciclo celular y la entrada de las células en senescencia, produciéndose una proliferación incontrolada, en una atmósfera de inestabilidad y aberraciones cromosómicas, que genera un tumor (Shay y Wright, 2010). El estudio de la función telomérica en los tumores gástricos muestra que existe un acortamiento telomérico con respecto al tejido no tumoral del propio paciente, más acusado en los primeros estadios tumorales, pero que se va reduciendo progresivamente a medida que el tumor crece. Esto se debe a que en el 77.6% de los tumores analizados, se produjo la reactivación de la enzima telomerasa, encargada de mantener la longitud de los telómeros para asegurar la supervivencia de la célula tumoral.

Además, observamos que la actividad enzimática era más intensa en los estadios iniciales, precisamente cuando el grado de proliferación de las células se encuentra más alterado, el grado de acortamiento es mayor, y la necesidad por parte de las células tumorales de mantener la longitud de sus telómeros es superior. Por consiguiente, tanto la presencia de longitudes teloméricas críticas, como la reactivación de la telomerasa, con-

tribuyen al inicio de la tumorigénesis gástrica y posterior desarrollo progresivo de la enfermedad. Esta disfunción telomérica es un evento común a muchos tipos tumorales, y son numerosos los trabajos que validan su potencial como marcador de pronóstico (García-Aranda et al., 2006; Frías et al., 2008; Martínez-Delgado et al., 2013; Weischer et al., 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios, ya que la presencia de acortamiento telomérico será sinónimo de mejor o peor pronóstico dependiendo del tipo tumoral estudiado.

Nuestros resultados revelaron que la presencia en los tejidos tumorales de telómeros extremadamente reducidos, concretamente, de longitudes inferiores a 2.86 kb, se asociaba con un significativo peor pronóstico clínico de los pacientes. Los conocimientos sobre la influencia de la función telomérica en el cáncer gástrico son escasos, y no se pudo comparar este resultado con ningún estudio similar, por lo que sería una afirmación muy preliminar asegurar el uso de la longitud telomérica como variable de pronóstico en los tumores gástricos; sin embargo, puede resultar útil para ayudar a la clasificación de los pacientes.

El gradual acortamiento telomérico que se observa en las etapas iniciales de la carcinogénesis gástrica, provoca la desprotección de los extremos de los cromosomas de las células, como se refleja con la disminución de la expresión génica de los factores de unión al telómero *TRF1* y *TRF2*, determinada en nuestra población de tumores gástricos. El grupo de pacientes que mostraron un peor pronóstico clínico en función de la longitud telomérica, presentaba tumores con telómeros críticamente acortados, de longitudes inferiores a 2.86 kb, y una disminución más acusada de la expresión génica de ambos factores de unión a los telómeros. Como se ha visto en varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, en los que se han delecionado *TRF1* y *TRF2* (Celli y Lange, 2005; Okamoto et al., 2008; Martínez et al., 2009), su falta se traduce en un aumento de la inestabilidad genómica, y en el desarrollo de tumores más agresivos. Además, los bajos niveles de expresión de *TRF1* y *TRF2* se encontraban correlacionados con un aumento de la actividad telomerasa, favoreciendo de esta forma también el avance de la enfermedad.

Respecto al estudio particular de la función telomérica en los tumores con alta inestabilidad en microsatélites, éste reveló que el acortamiento telomérico en este tipo tumoral era más acusado, y que la reactivación de la telomerasa se producía en la totalidad de los casos. Sin embargo, ninguno de estos factores demostró tener influencia en el diferente pronóstico clínico conferido por los tumores con alta inestabilidad en microsatélites, respecto a los tumores de baja inestabilidad o estables.

El mantenimiento de la longitud telomérica requiere de un delicado equilibrio entre acortamiento y elongación, en el que participan multitud de factores relacionados con los telómeros. Durante la carcinogénesis, el mantenimiento de la estructura telomérica y su función depende de la interacción entre la longitud del telómero, las proteínas teloméricas, la entrada en escena de la telomerasa, y multitud de factores relacionados con los telómeros. Tras el acortamiento telomérico, al alcanzar una longitud crítica, el correcto funcionamiento de cada uno de ellos inclinará la balanza hacia la entrada en senescencia de las células dañadas, o bien, hacia una continua proliferación, favoreciendo la inestabilidad genómica y la progresión tumoral.

Las proteínas del complejo *shelterin* se encargan de regular la longitud telomérica y proteger la estabilidad de la estructura telomérica. El estudio de expresión génica de las proteínas de unión al telómero, *TRF1* y *TRF2*, sí reveló diferencias entre los tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites y los de baja o nula inestabilidad. La disminución de la expresión de ambos factores era mucho más acusada en el caso de los tumores MSI-H. Por otro lado, el estudio de los niveles de transcripción telomérica mediante la cuantificación de las moléculas de ARN telomérico (TERRA) en ambos tipos tumorales, también reveló que en los tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites, los niveles de TERRA eran significativamente inferiores.

Una posible explicación de cómo estas diferencias podrían ser las causantes del mejor pronóstico observado en los pacientes con tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites, es que durante la replicación telomérica se produce una desprotección transitoria de los telómeros, y una serie de cambios epigenéticos, que conducen a la heterocromatina telomérica a un estado "abierto" que favorece la transcripción del ARN telomérico (TERRA). Reguladores transcripcionales como p53, pueden interaccionar con la

proteína MLL (*KMT2A*, *Lysine (K)-specific methyltransferase 2A*), y reclutar o activar este complejo proteico en los telómeros, induciendo la metilación de H3K4, favoreciendo la acetilación de H3K16 y, en última instancia, contribuyendo a la activación de TERRA (Caslini et al., 2009).

En los tumores gástricos MSI-H, nuestros resultados indican que los niveles de expresión génica de las proteínas de unión a telómeros, *TRF1* y *TRF2*, se encuentran disminuidas, generando un estado de desprotección del telómero permanente. En este caso, los mecanismos de reparación del ADN y el complejo MRE11, encargado de la regulación de los puntos de control del ciclo celular y de reparar el ADN (Deng et al., 2009a), reconocen a los telómeros como ADN dañado y ponen en marcha la transcripción de TERRA, a través del complejo MLL/p53. El aumento en la transcripción de TERRA, favorecería la estabilidad de la cromatina telomérica, y devolvería los telómeros a un estado de protección tras la replicación, pudiendo continuar con la proliferación celular (Caslini, 2010).

En el caso de los tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites, se han descrito mutaciones por delección de una o dos bases en una secuencia de poly(T) en MRE11, que lleva a una disminución de la expresión y funcionalidad del complejo MRE11/RAD50/NBS1 (Giannini et al., 2004; Ottini, 2004). Si este complejo no se encuentra funcional, la transcripción de TERRA no sería activada, y el estado de desprotección se convertiría en permanente, lo que provocaría la activación de los mecanismos de respuesta al daño en el ADN, que activarían las vías mediadas por p53/p21, llevando a la célula a un estado de senescencia. De esta forma, se estaría limitando la progresión tumoral, ya que las células dañadas no conseguirían continuar proliferando.

Por último, se realizó una aproximación al estudio del degradoma tumoral implicado en el desarrollo del cáncer gástrico. Los tumores gástricos son agresivos, altamente invasivos y generan recidivas en un porcentaje elevado de los casos diagnosticados. Las proteasas son enzimas que median en la proteólisis, relevantes en procesos como la angiogénesis, la invasión y la metástasis de las células tumorales. El estudio de 31 proteasas con importancia en este tipo de procesos, reveló la sobre-expresión en los tumores gástricos, de 14 de las 31 proteasas analizadas, reflejando así su papel en la progresión del cáncer gástrico.

Así mismo, un estudio comparativo de la expresión de estas proteasas en los tumores gástricos con inestabilidad en microsatélites respecto a los tumores gástricos con baja o nula inestabilidad, demostró que en los tumores clasificados como MSI-H, la expresión de 28 de las 31 proteasas analizadas se encontraba fuertemente disminuida y, de forma significativa, para seis de ellas: *ADAM15*, *ADAM23*, *DHH*, *SHH*, *HTRA-2* y el inhibidor de metaloproteasas, *TIMP2*. Por lo tanto, los procesos de invasión y metástasis se encuentran reprimidos en el caso de los tumores con alta inestabilidad en microsatélites, dando lugar a un menor grado de invasión ganglionar, ausencia de metástasis y, en definitiva, tumores menos agresivos. Estos resultados las hacen firmes candidatas a ser consideradas dianas moleculares de futuras terapias destinadas a limitar la progresión del cáncer gástrico.

Conclusiones 5

5.1

CONCLUSIONES

1. La inestabilidad en secuencias microsatélite se asocia con un pronóstico clínico favorable en cáncer gástrico, de forma independiente del estadio tumoral.
2. Los tumores gástricos con alta inestabilidad en secuencias microsatélite se relacionan, de forma significativa, con un menor grado de invasión ganglionar.
3. Los tumores gástricos de tipo histológico intestinal están significativamente asociados con una menor longitud telomérica y un mayor grado de acortamiento telomérico, con respecto al tejido no tumoral.
4. El acortamiento telomérico se relaciona significativamente con el estadio tumoral en cáncer gástrico, siendo los tumores de estadios más tempranos los que presentan un mayor grado de acortamiento de los telómeros, con respecto a los tejidos control.
5. Los tumores gástricos que presentan un menor grado de invasión muestran un acortamiento telomérico superior a los tumores gástricos con mayor capacidad invasiva.
6. Una longitud telomérica media tumoral inferior o igual a 2.86 kb se asocia con una evolución clínica desfavorable de los pacientes afectados de cáncer gástrico, de forma independiente del estadio tumoral.

7. Los tumores gástricos con alta inestabilidad en microsatélites presentan una disminución significativa de los niveles de expresión génica de *TRF1* y *TRF2*, y una disminución de los niveles de ARN telomérico (TERRA), con respecto a los tumores con baja o nula inestabilidad en microsatélites.
8. Los niveles de expresión génica de las proteasas *ADAM12*, *ADAMTS18*, *MMP3*, *MMP7*, *MMP9*, *MMP13*, *CASP5*, *KLK6*, *KLK10*, *SERPINE-1*, y *TIMP1*, implicadas en los mecanismos de invasión y metástasis del cáncer gástrico, se encuentran incrementados, de forma significativa, en la población tumoral analizada.
9. En los tumores gástricos con inestabilidad en microsatélites, la expresión de las proteasas *ADAM15*, *ADAM23*, *DHH*, *SHH*, *HTRA-2* y *TIMP2* se encuentra disminuida significativamente en comparación con los tumores gástricos con baja o nula inestabilidad en microsatélites.

Conclusión final

La inestabilidad en secuencias microsatélite y la función telomérica pueden considerarse parámetros moleculares con utilidad clínica en la evaluación del pronóstico de pacientes afectados de cáncer gástrico. Concretamente, los pacientes con tumores gástricos con alto grado de inestabilidad en microsatélites muestran un mejor pronóstico clínico, y la presencia en los tumores de telómeros con longitudes críticas es indicativa de una evolución clínica desfavorable. Sin embargo, en cáncer gástrico, el acortamiento no crítico de los telómeros está relacionado con variables de pronóstico favorable.

Bibliografía

6

6.1 BIBLIOGRAFÍA

Aaltonen, L.A., Peltomäki, P., Leach, F.S.,

Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J.P., Järvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., y Hamilton, S.R. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* (New York, N.Y.) 260, 812-6.

Adachi, Y., Yamamoto, H., Itoh, F., Hinoda, Y., Okada, Y., y Imai, K. (1999). Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 45, 252-8.

Ahn, M.J., Noh, Y.H., Lee, Y.S., Lee, J.H., Chung, T.J., Kim, I.S., Choi, I.Y., Kim, S.H., Lee, J.S., y Lee, K.H. (1997). Telomerase activity and its clinicopathological significance in gastric cancer. *European Journal Of Cancer* (Oxford, England : 1990) 33, 1309-13.

Aihara, R., Mochiki, E., Nakabayashi, T., Akazawa, K., Asao, T., y Kuwano, H. (2005). Clinical significance of mucin phenotype, beta-catenin and matrix metalloproteinase 7 in early undifferentiated gastric carcinoma. *The British Journal Of Surgery* 92, 454-62.

Alakus, H., Afriani, N., Warnecke-Eberz, U., Bollschweiler, E., Fetzner, U., Drebber, U., Metzger, R., Hölscher, A.H., y Mönig, S.P. (2010). Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *World Journal Of Surgery* 34, 2853-9.

An, C., Choi, I., Yao, J.C., Worah, S., Xie, K., Mansfield, P.F., Ajani, J.A., Rashid, A., Hamilton, S.R., y Wu, T. (2005). Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 11, 656-63.

Ancelin, K., Brunori, M., Bauwens, S., Koering, C., Brun, C., Ricoul, M., Pommier, J., Sabatier, L., y Gilson, E. (2002). Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Molecular And Cellular Biology* 22, 3474-87.

Angelidis, C., Deftereos, S., Giannopoulos, G., Anatoliotakis, N., Bouras, G., Hatzis, G., Panagopoulou, V., Pyrgakis, V., y Cleman, M.W. (2013). Cystatin C: an emerging biomarker in cardiovascular disease. *Current Topics In Medicinal Chemistry* 13, 164-79.

Armanios, M., y Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nature Reviews. Genetics* 13, 693-704.

Arnoult, N., van Beneden, A., y Decottignies, A. (2012). Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1 α . *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 948-56.

Arora, R., Brun, C.M., y Azzalin, C.M. (2012). Transcription regulates telomere dynamics in human cancer cells. *RNA (New York, N.Y.)* 18, 684-93.

Artandi, S.E., y Attardi, L.D. (2005). Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 331, 881-890.

Autexier, C., Pruzan, R., Funk, W.D., y Greider, C.W. (1996). Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *The EMBO Journal* 15, 5928-35.

Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., y Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science (New York, N.Y.)* 318, 798-801.

Bacani, J., Zwingerman, R., Di Nicola, N.,

Spencer, S., Wegrynowski, T., Mitchell, K., Hay, K., Redston, M., Holowaty, E., Huntsman, D., et al. (2005). Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer. *The Journal Of Molecular Diagnostics : JMD* 7, 465-77.

Barber, M., Fitzgerald, R.C., y Caldas, C. (2006). Familial gastric cancer - aetiology and pathogenesis. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 20, 721-34.

Baumann, P., y Price, C. (2010). POT1 and telomere maintenance. *FEBS Letters* 584, 3779-84.

Baur, J.A., Zou, Y., Shay, J.W., y Wright, W.E. (2001). Telomere position effect in human cells. *Science (New York, N.Y.)* 292, 2075-7.

Bayani, J., y Diamandis, E.P. (2012). The physiology and pathobiology of human kallikrein-related peptidase 6 (KLK6). *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine : CCLM / FESCC* 50, 211-33.

Baylin, S. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology* 2 Suppl 1, S4-11.

Bechter, O.E., Zou, Y., Walker, W., Wright, W.E., y Shay, J.W. (2004). Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Research* 64, 3444-51.

- Biffi, G., Tannahill, D., y Balasubramanian, S. (2012). An Intramolecular G-Quadruplex Structure Is Required for Binding of Telomeric Repeat-Containing RNA to the Telomeric Protein TRF2. *Journal Of The American Chemical Society* 134, 11974-11976.
- Biroccio, A., Rizzo, A., Elli, R., Koering, C., Belleville, A., Benassi, B., Leonetti, C., Stevens, M.F.G., D'Incalci, M., Zupi, G., et al. (2006). TRF2 inhibition triggers apoptosis and reduces tumorigenicity of human melanoma cells. *European Journal Of Cancer* 42, 1881-1888.
- Bisoffi, M., Heaphy, C.M., y Griffith, J.K. (2006). Telomeres: Prognostic markers for solid tumors. *International Journal Of Cancer* 119, 2255-2260.
- Blair, V., Martin, I., Shaw, D., Winship, I., Kerr, D., Arnold, J., Harawira, P., McLeod, M., Parry, S., Charlton, A., et al. (2006). Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Diagnosis and Management. *Clinical Gastroenterology And Hepatology* 4, 262-275.
- Blanco, R., Muñoz, P., Flores, J.M., Klatt, P., y Blasco, M.A. (2007). Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes & Development* 21, 206-20.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics* 6, 611-22.
- Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nature Reviews. Genetics* 8, 299-309.
- Blin, N., y Stafford, D. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 3, 2303-8.
- Blobel, C.P. (2002). Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflammation Research : Official Journal Of The European Histamine Research Society* 51, 83-4.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., y Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y.)* 279, 349-52.
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research* 58, 5248-57.
- Borrmann, R. (1927). *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie und histologie* (Berlin: Springer - Verlag).
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.
- Brew, K., Dinakarpandian, D., y Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1477, 267-83.
- Brueckl, W.M., Grombach, J., Wein, A., Ruckert, S., Porzner, M., Dietmaier, W., Rümmele, P., Croner, R.S., Boxberger, F., Kirchner, T., et al. (2005). Alterations in the

tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) are found frequently in human colorectal tumours displaying either microsatellite stability (MSS) or instability (MSI). *Cancer Letters* 223, 137-142.

Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., y Reddel, R.R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Medicine* 3, 1271-4.

Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., y Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO Journal* 14, 4240-8.

Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B., Györfy, B., Schmitt, W., Darb-Esfahani, S., y Denkert, C. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *Plos One* 7, e51862.

Buffart, T.E., Carvalho, B., Mons, T., Reis, R.M., Moutinho, C., Silva, P., van Grieken, N.C., Vieth, M., Stolte, M., van de Velde, C.J., et al. (2007). DNA copy number profiles of gastric cancer precursor lesions. *BMC Genomics* 8, 345-0.

Burke, A.P., Yen, T.S., Shekitka, K.M., y Sobin, L.H. (1990). Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Modern Pathology : An Official Journal Of The United States And Canadian Academy Of Pathology, Inc* 3, 377-80.

Cal, S., Obaya, A.J., Llamazares, M., Garabaya, C., Quesada, V., y López-Otín, C. (2002). Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 283, 49-62.

Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal Of Cancer (Oxford, England : 1990)* 33, 703-9.

Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-22.

Cao, J., Sato, H., Takino, T., y Seiki, M. (1995). The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *The Journal Of Biological Chemistry* 270, 801-5.

Carl-McGrath, S., Lendeckel, U., Ebert, M., Roessner, A., y Röcken, C. (2005). The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *International Journal Of Oncology* 26, 17-24.

Carr, J.S., Zafar, S.F., Saba, N., Khuri, F.R., y El-Rayes, B.F. (2013). Risk factors for rising incidence of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Journal Of Gastrointestinal Cancer* 44, 143-51.

Carvalho, B., Pinto, M., Cirnes, L., Oliveira, C., Machado, J.C., Suriano, G., Hamelin, R., Carneiro, F., y Seruca, R. (2003). Concurrent hypermethylation of gene promoters is associated with a MSI-H phenotype and diploidy in gastric carcinomas. *European Journal Of Cancer (Oxford, England : 1990)* 39, 1222-7.

- Caslini, C. (2010). Transcriptional regulation of telomeric non-coding RNA: implications on telomere biology, replicative senescence and cancer. *RNA Biology* 7, 18-22.
- Caslini, C., Connelly, J.A., Serna, A., Broccoli, D., y Hess, J.L. (2009). MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. *Molecular And Cellular Biology* 29, 4519-26.
- Cawthon, R.M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* 30, e47.
- Celli, G.B., y Lange, T. (2005). DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nature Cell Biology* 7, 712-718.
- Chen, J., Opperman, K.K., y Greider, C.W. (2002). A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Research* 30, 592-7.
- Chen, J.L., Blasco, M.A., y Greider, C.W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503-14.
- Chin, L., Artandi, S.E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S.L., Gottlieb, G.J., Greider, C.W., y DePinho, R.A. (1999). p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 97, 527-38.
- Choi, S.W., Park, S.W., Lee, K.Y., Kim, K.M., Chung, Y.J., y Rhyu, M.G. (1998). Fractional allelic loss in gastric carcinoma correlates with growth patterns. *Oncogene* 17, 2655-9.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-9.
- Cong, Y., Wright, W.E., y Shay, J.W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology And Molecular Biology Reviews : MMBR* 66, 407-25.
- Cong, Y.S., y Bacchetti, S. (2000). Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 275, 35665-8.
- Conomos, D., Pickett, H.A., y Reddel, R.R. (2013). Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture. *Frontiers In Oncology* 3, 1-7
- Cook, B.D., Dynek, J.N., Chang, W., Shostak, G., y Smith, S. (2002). Role for the related poly (ADP-ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Molecular And Cellular Biology* 22, 332-42.
- Cookson, J.C., y Loughton, C.A. (2009). The levels of telomere-binding proteins in human tumours and therapeutic implications. *European Journal Of Cancer* 45, 536-550.
- Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tanenbaum, S., y Archer, M. (1975). A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 2, 58-60.
- Correa, P., y Houghton, J. (2007). Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133, 659-672.

- Cosme-Blanco, W., y Chang, S. (2008). Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. *Experimental Cell Research* 314, 1973-9.
- Crew, K.D., y Neugut, A.I. (2006). Epidemiology of gastric cancer. *World Journal Of Gastroenterology : WJG* 12, 354-62.
- César, A., de Calmon, M.F., Cury, P.M., Caetano, A., Borim, A.A., y Silva, A.E. (2006). Genetic alterations in benign lesions: chronic gastritis and gastric ulcer. *World Journal Of Gastroenterology : WJG* 12, 625-9.
- Corso, G., Pedrazzani, C., Marrelli, D., Pascale, V., Pinto, E., y Roviello, F. (2009). Correlation of microsatellite instability at multiple loci with long-term survival in advanced gastric carcinoma. *Archives Of Surgery* 144, 722-7.
- D'Elia, L., Rossi, G., Ippolito, R., Cappuccio, F.P., y Strazzullo, P. (2012). Habitual salt intake and risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 31, 489-98.
- Darzacq, X., Kittur, N., Roy, S., Shav-Tal, Y., Singer, R.H., y Meier, U.T. (2006). Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *The Journal Of Cell Biology* 173, 207-18.
- Deng, Y., Chan, S.S., y Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nature Reviews. Cancer* 8, 450-8.
- Deng, Y., Guo, X., Ferguson, D.O., y Chang, S. (2009a). Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. *Nature* 460, 914-8.
- Deng, Y., y Chang, S. (2007). Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Laboratory Investigation* 87, 1071-1076.
- Deng, Z., Campbell, A.E., y Lieberman, P.M. (2010). TERRA, CpG methylation and telomere heterochromatin: lessons from ICF syndrome cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9, 69-74.
- Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., y Lieberman, P.M. (2009b). TERRA RNA Binding to TRF2 Facilitates Heterochromatin Formation and ORC Recruitment at Telomeres. *Molecular Cell* 35, 1-11.
- Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H., Hu, S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R.V., Bartolomei, M.S., et al. (2012a). A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *The EMBO Journal* 31, 4165-78.
- Deng, Z., Wang, Z., Xiang, C., Molczan, A., Baubet, V., Conejo-Garcia, J., Xu, X., Lieberman, P.M., y Dahmane, N. (2012b). Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *Journal Of Cell Science* 125, 4383-94.
- Dessain, S.K., Yu, H., Reddel, R.R., Beijersbergen, R.L., y Weinberg, R.A. (2000). Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Research* 60, 537-41.

Deville, L., Hillion, J., Lanotte, M., Rousselot, P., y Ségal-Bendirdjian, E. (2006). Diagnostics, prognostic and therapeutic exploitation of telomeres and telomerase in leukemias. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 171-83.

Diala, I., Wagner, N., Magdinier, F., Shkreli, M., Sirakov, M., Bauwens, S., Schluth-Bolard, C., Simonet, T., Renault, V.M., Ye, J., et al. (2013). Telomere protection and TRF2 expression are enhanced by the canonical Wnt signalling pathway. *EMBO Reports* 14, 356-363.

Diaz-Padilla, I., Romero, N., Amir, E., Matias-Guiu, X., Vilar, E., Muggia, F., y Garcia-Donas, J. (2013). Mismatch repair status and clinical outcome in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews In Oncology/Hematology* 88, 154-167.

Dimmler, A., Brabletz, T., Hlubek, F., Häfner, M., Rau, T., Kirchner, T., y Faller, G. (2003). Transcription of sonic hedgehog, a potential factor for gastric morphogenesis and gastric mucosa maintenance, is up-regulated in acidic conditions. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology* 83, 1829-37.

Duan, L., Wu, A.H., Sullivan-Halley, J., y Bernstein, L. (2009). Passive smoking and risk of oesophageal and gastric adenocarcinomas. *British Journal Of Cancer* 100, 1483-5.

Duell, E.J., Lujan-Barroso, L., Llivina, C., Muñoz, X., Jenab, M., Boutron-Ruault, M., Clavel-Chapelon, F., Racine, A., Boeing, H., Buijsse, B., et al. (2013). Vitamin C transporter gene (SLC23A1 and SLC23A2) polymorphisms, plasma vitamin C levels, and gastric cancer risk in the EPIC cohort. *Genes & Nutrition* 8, 549-60.

Duffy, M.J., Mullooly, M., O'Donovan, N., Sukor, S., Crown, J., Pierce, A., y McGowan, P.M. (2011). The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Clinical Proteomics* 8, 9.

Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L., y Reddel, R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genetics* 26, 447-50.

Duval, A., y Hamelin, R. (2002). Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Annales De Génétique* 45, 1-5.

D'Errico, M., Rinaldis, E., Blasi, M.F., Viti, V., Falchetti, M., Calcagnile, A., Sera, F., Saieva, C., Ottini, L., Palli, D., et al. (2009). Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. *European Journal Of Cancer* 45, 461-469.

Egan, E.D., y Collins, K. (2010). Specificity and stoichiometry of subunit interactions in the human telomerase holoenzyme assembled in vivo. *Molecular And Cellular Biology* 30, 2775-86.

Egeblad, M., y Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2, 161-174.

Elnemr, A., Yonemura, Y., Bandou, E., Kinoshita, K., Kawamura, T., Takahashi, S., Tochiori, S., Endou, Y., y Sasaki, T. (2003). Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in human gastric cancer. *Gastric Cancer : Official Journal Of The International Gastric Cancer Association And The Japanese Gastric Cancer Association* 6, 30-8.

El-Rifai, W., Frierson, H.F., Moskaluk, C.A., Harper, J.C., Petroni, G.R., Bissonette, E.A., Jones, D.R., Knuutila, S., y Powell, S.M. (2001). Genetic differences between adenocarcinomas arising in Barrett's esophagus and gastric mucosa. *Gastroenterology* 121, 592-598.

Emonard, H.P., Remacle, A.G., Noël, A.C., Grimaud, J.A., Stetler-Stevenson, W.G., y Foidart, J.M. (1992). Tumor cell surface-associated binding site for the M(r) 72,000 type IV collagenase. *Cancer Research* 52, 5845-8.

Eslick, G. (2006). *Helicobacter pylori* infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. *World Journal Of Gastroenterology : WJG* 12, 2991-9.

Falchetti, M., Saieva, C., Lupi, R., Masala, G., Rizzolo, P., Zanna, I., Ceccarelli, K., Sera, F., Mariani-Costantini, R., Nesi, G., et al. (2008). Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Human Pathology* 39, 925-932.

Fang, D.C., Yang, S.M., Zhou, X.D., Wang, D.X., y Luo, Y.H. (2001). Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World Journal Of Gastroenterology : WJG* 7, 522-6.

Fang, W., Chang, S., Lan, Y., Huang, K., Chen, J., Lo, S., Hsieh, M., Li, A.F., Wu, C., y Chiou, S. (2012). Microsatellite instability is associated with a better prognosis for gastric cancer patients after curative surgery. *World Journal Of Surgery* 36, 2131-2138.

Farnung, B.O., Brun, C.M., Arora, R., Lorenzi, L.E., y Azzalin, C.M. (2012). Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. *Plos One* 7, e35714.

Feng, B., Xu, W., Zheng, M., Ma, J., Cai, Q., Zhang, Y., Ji, J., Lu, A., Qu, Y., Li, J., et al. (2006). Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. *Journal Of Gastroenterology And Hepatology* 21, 1596-603.

Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., y Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science (New York, N.Y.)* 269, 1236-41.

Feng, R., Xiao, C., y Zavros, Y. (2012). The role of Sonic Hedgehog as a regulator of gastric function and differentiation. *Vitamins And Hormones* 88, 473-89.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., y Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal Of Cancer*.

Flynn, R.L., Centore, R.C., O'Sullivan, R.J., Rai, R., Tse, A., Songyang, Z., Chang, S., Karlseder, J., y Zou, L. (2011). TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature* 471, 532-6.

Foda, H.D., y Zucker, S. (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discovery Today* 6, 478-482.

Fordyce, C.A., Heaphy, C.M., Bisoffi, M., Wyaco, J.L., Joste, N.E., Mangalik, A., Baumgartner, K.B., Baumgartner, R.N., Hunt, W.C., y Griffith, J.K. (2006). Telomere content correlates with stage and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Research And Treatment* 99, 193-202.

Frejlich, E., Rudno-Rudzińska, J., Janiszewski, K., Salomon, L., Kotulski, K., Pelzer, O., Grzebieniak, Z., Tarnawa, R., y Kielan, W. (2013). Caspases and their role in gastric cancer. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wrocław Medical University* 22, 593-602.

Frías, C., García-Aranda, C., de De Juan, C., de Juan, C., Morán, A., Ortega, P., Gómez, A., Hernando, F., López-Asenjo, J., Torres, A., et al. (2008). Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 60, 416-425.

Fu, X., Deng, H., Zhao, L., Li, J., Zhou, Y., y Zhang, Y. (2010a). Distinct expression patterns of hedgehog ligands between cultured and primary colorectal cancers are associated with aberrant methylation of their promoters. *Molecular and Cellular Biochemistry* 337, 185-92.

Fu, X., Yang, X., Li, Y., Tian, X., Cai, J., y Zhang, Y. (2010b). Opposite expression patterns of Sonic hedgehog and Indian hedgehog are associated with aberrant methylation status of their promoters in colorectal cancers. *Pathology* 42, 553-9.

Gafà, R., Maestri, I., Matteuzzi, M., Santini, A., Ferretti, S., Cavazzini, L., y Lanza, G. (2000). Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 89, 2025-37.

Gancarcíková, M., Zemanová, Z., Brezinová, J., Berková, A., Vcelíková, S., Smigová, J., y Michalová, K. (2010). The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: the length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease. *Prague Medical Report* 111, 91-105.

Gao, F., Zhang, W., Jing, S., Liu, Y., y Zhang, B. (1999). Detection of telomerase activity in gastric cancer and adjacent tissues. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* 21, 298-301.

- García-Aranda, C., de Juan, C., Díaz-López, A., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A., Díaz-Rubio, E., Balibrea, J., Benito, M., y Iniesta, P. (2006). Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer* 106, 541-551.
- García-Cao, M., Gonzalo, S., Dean, D., y Blasco, M.A. (2002). A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length. *Nature Genetics* 32, 415-9.
- García-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H., Jenuwein, T., y Blasco, M.A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nature Genetics* 36, 94-9.
- Geiger, T.R., and Peeper, D.S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1796, 293-308.
- Gencer, S., Cebeci, A., y Irmak-Yazicioglu, M.B. (2011). Silencing of the MMP-3 gene by siRNA transfection in gastric cancer AGS cells. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD* 20, 19-26.
- Gertler, R., Rosenberg, R., Stricker, D., Friederichs, J., Hoos, A., Werner, M., Ulm, K., Holzmann, B., Nekarda, H., y Siewert, J. (2004). Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 1-8.
- Gialeli, C., Theocharis, A.D., y Karamanos, N.K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS Journal* 278, 16-27.
- Giannini, G., Rinaldi, C., Ristori, E., Ambrosini, M.L., Cerignoli, F., Viel, A., Bidoli, E., Berni, S., D'Amati, G., Scambia, G., et al. (2004). Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 23, 2640-7.
- Goetz, J.A., Singh, S., Suber, L.M., Kull, F.J., y Robbins, D.J. (2006). A highly conserved amino-terminal region of sonic hedgehog is required for the formation of its freely diffusible multimeric form. *The Journal Of Biological Chemistry* 281, 4087-93.
- Gonzalo, S., García-Cao, M., Fraga, M.F., Schotta, G., Peters, A.H., Cotter, S.E., Eguía, R., Dean, D.C., Esteller, M., Jenuwein, T., et al. (2005). Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nature Cell Biology* 7, 420-8.
- Gonzalo, S., Jaco, I., Fraga, M.F., Chen, T., Li, E., Esteller, M., y Blasco, M.A. (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 8, 416-24.
- Goueli, B.S., y Janknecht, R. (2004). Up-regulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ERB1 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Molecular And Cellular Biology* 24, 25-35.
- Grabsch, H.I., y Tan, P. (2013). Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Digestive Surgery* 30, 150-8.

Graziano, F., Arduini, F., Ruzzo, A., Bearzi, I., Humar, B., More, H., Silva, R., Muretto, P., Guilford, P., Testa, E., et al. (2004). Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 10, 2784-9.

Greider, C.W., y Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-13.

Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., y de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-14.

Guo, C., Armbruster, B.N., Price, D.T., y Counter, C.M. (2003). In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *The Journal Of Urology* 170, 615-8.

Halling, K.C., Harper, J., Moskaluk,

C.A., Thibodeau, S.N., Petroni, G.R., Yustein, A.S., Tosi, P., Minacci, C., Roviello, F., Piva, P., et al. (1999). Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *The American Journal Of Pathology* 155, 205-11.

Hanahan, D., y Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.

Hanahan, D., y Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hande, M.P. (2004). DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenetic And Genome Research* 104, 116-22.

Handsley, M.M., y Edwards, D.R. (2005). Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International Journal Of Cancer* 115, 849-60.

Hansel, R., Lohr, F., Foldynova-Trantirkova, S., Bamberg, E., Trantirek, L., y Dotsch, von (2011). The parallel G-quadruplex structure of vertebrate telomeric repeat sequences is not the preferred folding topology under physiological conditions. *Nucleic Acids Research* 39, 5768-5775.

Hansen, S., Vollset, S.E., Derakhshan, M.H., Fyfe, V., Melby, K.K., Aase, S., Jellum, E., y McColl, K.E. (2007). Two distinct aetiologies of cardia cancer; evidence from premorbid serological markers of gastric atrophy and *Helicobacter pylori* status. *Gut* 56, 918-25.

Harley, C.B., Futcher, A.B., y Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-60.

Hartgrink, H.H., Jansen, E.P., Grieken, N.C., Velde, C.J., van der Grieken, N.C., y van de Velde, C.J. (2009). Gastric cancer. *The Lancet* 374, 477-490.

He, C., Chen, M., Liu, J., y Yuan, Y. (2014). Host genetic factors respond to pathogenic step-specific virulence factors of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research* 759, 14-26.

- Heaphy, C.M., Yoon, G.S., Peskoe, S.B., Joshu, C.E., Lee, T.K., Giovannucci, E., Mucci, L.A., Kenfield, S.A., Stampfer, M.J., Hicks, J.L., et al. (2013). Prostate cancer cell telomere length variability and stromal cell telomere length as prognostic markers for metastasis and death. *Cancer Discovery* 3, 1130-41.
- Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R., y Reddel, R.R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21, 598-610.
- Hiyama, E., Yokoyama, T., Tatsumoto, N., Hiyama, K., Imamura, Y., Murakami, Y., Kodama, T., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., y Matsuura, Y. (1995). Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Research* 55, 3258-62.
- Hiyama, E., y Hiyama, K. (2002). Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 21, 1-7.
- Hiyama, T., Tanaka, S., Yoshihara, M., Sasao, S., Kose, K., Shima, H., Tuncel, H., Ueno, Y., Ito, M., Kitadai, Y., et al. (2004). Chromosomal and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *Journal Of Gastroenterology And Hepatology* 19, 756-760.
- Honda, M., Mori, M., Ueo, H., Sugimachi, K., y Akiyoshi, T. (1996). Matrix metalloproteinase-7 expression in gastric carcinoma. *Gut* 39, 444-8.
- Hong, S.P., Min, B.S., Kim, il, T., Cheon, J.H., Kim, N.K., Kim, H., y Kim, W.H. (2012). The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumour response between colon cancer and rectal cancer. *European Journal Of Cancer* 48, 1235-1243.
- Hou, L., Savage, S.A., Blaser, M.J., Perez-Perez, G., Hoxha, M., Dioni, L., Pegoraro, V., Dong, L.M., Zatonski, W., Lissowska, J., et al. (2009). Telomere length in peripheral leukocyte DNA and gastric cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication Of The American Association For Cancer Research, Cosponsored By The American Society Of Preventive Oncology* 18, 3103-9.
- Hsu, C.P., Miaw, J., Shai, Sen, E., y Chen, C.Y. (2004). Correlation between telomerase expression and terminal restriction fragment length ratio in non-small cell lung cancer--an adjusted measurement and its clinical significance. *European Journal Of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal Of The European Association For Cardio-Thoracic Surgery* 26, 425-31.
- Hu, H., Zhang, Y., Zou, M., Yang, S., y Liang, X. (2010). Expression of TRF1, TRF2, TIN2, TERT, KU70, and BRCA1 proteins is associated with telomere shortening and may contribute to multistage carcinogenesis of gastric cancer. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology* 136, 1407-14.
- Hu, J., Sun, L., Zhang, C., y Zhou, X. (2006). Expression of telomeric repeat binding factor 1 in non-small cell lung cancer. *Journal Of Surgical Oncology* 93, 62-7.
- Hu, X., Wu, H., Zhang, S., Yuan, H., y Cao, L. (2009). Clinical significance of telomerase activity in gastric carcinoma and peritoneal dissemination. *The Journal Of International Medical Research* 37, 1127-38.
- Huang, W., Tian, X., Wu, Y., Zhong, J., Yu, L., Hu, S., y Li, B. (2008). Suppression of gastric cancer growth by baculovirus vector-mediated transfer of normal epithelial cell specific-1 gene. *World Journal Of Gastroenterology : WJG* 14, 5810-5.

Huang, W., Zhong, J., Wu, L., Yu, L., Tian, X., Zhang, Y., y Li, B. (2007). Downregulation and CpG island hypermethylation of NES1/hK10 gene in the pathogenesis of human gastric cancer. *Cancer Letters* 251, 78-85.

Hukezalie, K.R., y Wong, J.M. (2013). Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *The FEBS Journal* 280, 3194-204.

IARC (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France: International Agency For Research On Cancer; 2013. 61, 1-241.

Iacopetta, B.J., Soong, R., House, A.K., y Hamelin, R. (1999). Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF-beta type II receptor, IGFII receptor, and BAX genes. *The Journal Of Pathology* 187, 428-32.

Ibanez, I., Frolova, N., Varkonyi, R.J., Dulaimi, E., Meropol, N.J., Broccoli, D., y Cairns, P. (2004). Telomerase is frequently activated in tumors with microsatellite instability. *Cancer Biology & Therapy* 3, 289-92.

Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M., y Yoshiyama, H. (2012). Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses* 4, 3420-39.

Iniesta, P., Morán, A., de Juan, C., Gómez, A., Hernando, F., García-Aranda, C., Frías, C., Díaz-López, A., Rodríguez-Jiménez, F., Balibrea, J., et al. (2007). Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports* 17, 217-23.

Iozzo, R.V., Zoeller, J.J., y Nyström, A. (2009). Basement membrane proteoglycans: modulators par excellence of cancer growth and angiogenesis. *Molecules And Cells* 27, 503-13.

JGCA (2011). Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. Gastric Cancer : Official Journal Of The International Gastric Cancer Association And The Japanese Gastric Cancer Association 14, 101-12.

Jacobs, J.J., y Lange, T. (2005). p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4, 1364-8.

Jakszyn, P., Agudo, A., Lujan-Barroso, L., Bueno-de-Mesquita, H.B., Jenab, M., Navarro, C., Palli, D., Boeing, H., Manjer, J., Numans, M.E., et al. (2012). Dietary intake of heme iron and risk of gastric cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *International Journal Of Cancer* 130, 2654-63.

Jang, B., y Kim, W.H. (2011). Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology : Journal Of Immunopathology, Molecular And Cellular Biology* 78, 302-10.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., y Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal For Clinicians* 61, 1-22.

Jenab, M., Riboli, E., Ferrari, P., Sabate, J., Slimani, N., Norat, T., Friesen, M., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., et al. (2006). Plasma and dietary vitamin C levels and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Carcinogenesis* 27, 2250-7.

Jiao, X., Lu, H., Zhai, M., Tan, Z., Zhi, H., Liu, X., Liu, C., y Zhang, D. (2013). Overexpression of kallikrein gene 10 is a biomarker for predicting poor prognosis in gastric cancer. *World Journal Of Gastroenterology : WJG* 19, 9425-31.

Jones, L.E., Humphreys, M.J., Campbell, F., Neoptolemos, J.P., y Boyd, M.T. (2004). Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 10, 2832-45.

Jones, P.A., y Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews* 3, 415-428.

Jong, H.S., Park, Y.I., Kim, S., Sohn, J.H., Kang, S.H., Song, S.H., Bang, Y.J., y Kim, N.K. (1999). Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer* 86, 559-65.

Kang, D., Han, M., Song, M., Lee, Y.,

Kim, E., Kim, H., Kim, G., Kim, D., Yoon, S., Baek, S., et al. (2009). The role of hedgehog signaling during gastric regeneration. *Journal Of Gastroenterology* 44, 372-379.

Kang, G.H., Lee, S., Kim, J., y Jung, H. (2003). Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology* 83, 635-41.

Kang, Y., Lee, H.S., y Kim, W.H. (2002). Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology* 82, 285-91.

Kasperczyk, H., Baumann, B., Debatin, K., y Fulda, S. (2009). Characterization of sonic hedgehog as a novel NF-kappaB target gene that promotes NF-kappaB-mediated apoptosis resistance and tumor growth in vivo. *FASEB Journal : Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology* 23, 21-33.

Kato, Y., y Kato, M. (2005). Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biology & Therapy* 4, 1050-4.

Kato, Y., y Kato, M. (2006). Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network. *International Journal Of Molecular Medicine* 18, 1019-23.

- Kim, H., Kim, Y.H., Kim, S.E., Kim, N., Noh, S.H., y Kim, H. (2003). Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *The Journal Of Pathology* 200, 23-31.
- Kim, J.J., Kim, J., Yoon, H.R., Kang, M.A., Kim, J.H., Lee, Y., Kim, J.W., Lee, S., Song, E.Y., Myung, P.K., et al. (2012). Upregulation and secretion of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) in gastric cancer. *Tumour Biology : The Journal Of The International Society For Oncodevelopmental Biology And Medicine* 33, 731-8.
- Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., Coviello, G., Wright, W., Weinrich, S., y Shay, J. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, N.Y.)* 266, 2011-5.
- Kim, S., Beausejour, C., Davalos, A.R., Kaminker, P., Heo, S., y Campisi, J. (2004). TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *The Journal Of Biological Chemistry* 279, 43799-804.
- Kim, S.H., Ahn, B.K., Nam, Y.S., Pyo, J.Y., Oh, Y.H., y Lee, K.H. (2010). Microsatellite instability is associated with the clinicopathologic features of gastric cancer in sporadic gastric cancer patients. *Journal Of Gastric Cancer* 10, 149.
- Kimura, A., Ohmichi, M., Kawagoe, J., Kyo, S., Mabuchi, S., Takahashi, T., Ohshima, C., Arimoto-Ishida, E., Nishio, Y., Inoue, M., et al. (2004). Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via AKT cascade in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene* 23, 4505-15.
- Kneller, R.W., You, W.C., Chang, Y.S., Liu, W.D., Zhang, L., Zhao, L., Xu, G.W., Fraumeni, J.F., y Blot, W.J. (1992). Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *Journal Of The National Cancer Institute* 84, 1261-6.
- Koering, C.E., Pollice, A., Zibella, M.P., Bauwens, S., Puisieux, A., Brunori, M., Brun, C., Martins, L., Sabatier, L., Pulitzer, J.F., et al. (2002). Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Reports* 3, 1055-61.
- Koo, S.H., Jeong, T.E., Kang, J., Kwon, K.C., Park, J.W., y Noh, S.M. (2004). Prognostic implications for gastric carcinoma based on loss of heterozygosity genotypes correlation with clinicopathologic variables. *Cancer Genetics And Cytogenetics* 153, 26-31.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Hori-kawa, I., Barrett, J.C., y Huang, L.E. (2004). HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO Journal* 23, 1949-56.
- Krajewska, M., Kim, H., Shin, E., Kennedy, S., Duffy, M.J., Wong, Y.F., Marr, D., Miko-lajczyk, J., Shabaik, A., Meinhold-Heerlein, I., et al. (2005). Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. *Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 11, 5462-71.

- Kushi, L.H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C.L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E.V., Gapstur, S., Patel, A.V., Andrews, K., y Gansler, T. (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: A Cancer Journal For Clinicians* 62, 30-67.
- Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M., Tanaka, M., Yamashita, A., Inoue, H., y Inoue, M. (1999). Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant, borderline and benign tumors. *International Journal Of Cancer* 80, 804-9.
- Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M., Tanaka, M., y Inoue, M. (1998). Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *International Journal Of Cancer* 80, 60-63.
- Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., y Inoue, M. (2008). Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Science* 99, 1528-38.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., y Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-20.
- Ladeiras-Lopes, R., Pereira, A.K., Nogueira, A., Pinheiro-Torres, T., Pinto, I., Santos-Pereira, R., y Lunet, N. (2008). Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes & Control : CCC* 19, 689-701.
- Landsverk, H.B., Mora-Bermúdez, F., Landsverk, O.J., Hasvold, G., Naderi, S., Bakke, O., Ellenberg, J., Collas, P., Syljuåsen, R.G., y Küntziger, T. (2010). The protein phosphatase 1 regulator PNUTS is a new component of the DNA damage response. *EMBO Reports* 11, 868-75.
- Lange, T. (1995). Telomere dynamics and genome instability in human cancer. *Cold Spring Harbor Monograph*.
- Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5, 323-9.
- Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* 19, 2100-10.
- Lange, T., Shive, L., Myers, R., Cox, D., Naylor, S., Killery, A., y Varmus, H. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Molecular And Cellular Biology* 10, 518-27.
- Lauren, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: difusse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica* 64, 31-49.

- Lee, H.S., Choi, S.I., Lee, H.K., Kim, H.S., Yang, H., Kang, G.H., Kim, Y., Lee, B.L., y Kim, W.H. (2002). Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Modern Pathology : An Official Journal Of The United States And Canadian Academy Of Pathology* 15, 632-40.
- Lee, J., Park, S., Abraham, S., Seo, J., Nam, J., Choi, C., Juhng, S., Rashid, A., Hamilton, S., y Wu, T. (2004). Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene* 23, 4646-54.
- Li, B., Oestreich, S., y Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101, 471-83.
- Li, H., Xu, D., Li, J., Berndt, M.C., y Liu, J. (2006). Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *The Journal Of Biological Chemistry* 281, 25588-600.
- Li, W., Li, L., Liu, Z., Liu, C., Liu, Z., Strååt, K., Björkholm, M., Jia, J., y Xu, D. (2008). Expression of the full-length telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcript in both malignant and normal gastric tissues. *Cancer Letters* 260, 28-36.
- Lin, C., Lai, Y., Lin, T., Chen, W., Jiang, J., Yang, S., Wang, H., Lan, Y., Liang, W., Hsu, H., et al. (2012). Clinicopathologic features and prognostic analysis of MSI-high colon cancer. *International Journal Of Colorectal Disease* 27, 277-286.
- Lipps, H.J., y Rhodes, D. (2009). G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends In Cell Biology* 19, 414-22.
- Liu, D., Safari, A., O'Connor, M.S., Chan, D.W., Laegeler, A., Qin, J., y Songyang, Z. (2004). POT1 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nature Cell Biology* 6, 673-80.
- Liu, X., Bao, G., Huo, T., Wang, Z., He, X., y Dong, G. (2009). Constitutive telomere length and gastric cancer risk: case-control analysis in Chinese Han population. *Cancer Science* 100, 1300-5.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-8.
- Loayza, D., y Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423, 1013-8.
- Londoño-Vallejo, J.A. (2008). Telomere instability and cancer. *Biochimie* 90, 73-82.
- Lopez-Otin, C., y Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal Of Biological Chemistry* 283, 30433-30437.
- Lou, F., Chen, X., Jalink, M., Zhu, Q., Ge, N., Zhao, S., Fang, X., Fan, Y., Björkholm, M., Liu, Z., et al. (2007). The opposing effect of hypoxia-inducible factor-2alpha on expression of telomerase reverse transcriptase. *Molecular Cancer Research : MCR* 5, 793-800.
- Lu, L., Zhang, C., Zhu, G., Irwin, M., Risch, H., Menato, G., Mitidieri, M., Katsaros, D., y Yu, H. (2011). Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Research : BCR* 13, R56.

Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z., y Lingner, J. (2008). The Rat1p 5" to 3" exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* 32, 465-77.

López, I., D'Alcontres, M.S., y Blasco, M.A. (2010). TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nature Communications* 1, 33.

Lü, M., Deng, J., Cao, Y., Fang, D., Zhang, Y., y Yang, S. (2012). Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis. *Experimental And Therapeutic Medicine* 3, 728-734.

Ma, X., Chen, K., Huang, S., Zhang, X.,

Adegboyega, P.A., Evers, B.M., Zhang, H., y Xie, J. (2005). Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 26, 1698-705.

Mabruk, M.J., y O'Flatharta, C. (2005). Telomerase: is it the future diagnostic and prognostic tool in human cancer?. *Expert Review Of Molecular Diagnostics* 5, 907-16.

Maicher, A., Kastner, L., Dees, M., y Luke, B. (2012). Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. *Nucleic Acids Research* 40, 6649-59.

Maida, Y., Kyo, S., Kanaya, T., Wang, Z., Yatabe, N., Tanaka, M., Nakamura, M., Ohmichi, M., Gotoh, N., Murakami, S., et al. (2002). Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 21, 4071-9.

Martin, A., y Scharff, M.D. (2002). AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nature Reviews. Immunology* 2, 605-14.

Martin, J., Donnelly, J.M., Houghton, J., y Zavros, Y. (2010). The Role of Sonic Hedgehog reemergence during gastric cancer. *Digestive Diseases And Sciences* 55, 1516-1524.

Martinez, P., Thanasoula, M., Carlos, A.R., Gómez-López, G., Tejera, A.M., Schoeffner, S., Dominguez, O., Pisano, D.G., Tarsounas, M., y Blasco, M.A. (2010). Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nature Cell Biology* 12, 768-80.

Martinez-Delgado, B., Gallardo, M., Tanic, M., Yanowsky, K., Inglada-Perez, L., Barroso, A., Rodriguez-Pinilla, M., Cañamero, M., Blasco, M.A., y Benitez, J. (2013). Short telomeres are frequent in hereditary breast tumors and are associated with high tumor grade. *Breast Cancer Research And Treatment* 141, 231-42.

Martínez, P., Thanasoula, M., Muñoz, P., Liao, C., Tejera, A., McNees, C., Flores, J.M., Fernández-Capetillo, O., Tarsounas, M., y Blasco, M.A. (2009). Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes & Development* 23, 2060-75.

- Martínez, P., y Blasco, M.A. (2010). Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell* 9, 653-66.
- Maruyama, Y., Hanai, H., Fujita, M., y Kaneko, E. (1997). Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach. *Japanese Journal Of Clinical Oncology* 27, 216-20.
- Mathon, N.F., y Lloyd, A.C. (2001). Milestones in cell division : Cell senescence and cancer. *Nature Cell Biology* 3, E265.
- Matsutani, N., Yokozaki, H., Tahara, E., Tahara, H., Kuniyasu, H., Haruma, K., Chayama, K., y Yasui, W. (2001). Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. *International Journal Of Oncology* 19, 507-12.
- McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *zea mays*. *Genetics* 26, 234-82.
- McColl, K.E. (2006). Cancer of the gastric cardia. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 20, 687-96.
- McIlwain, D.R., Berger, T., y Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* 5, a008656-a008656.
- Mendez-Bermudez, A., y Royle, N. (2011). Deficiency in DNA mismatch repair increases the rate of telomere shortening in normal human cells. *Human Mutation* 32, 939-46.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., y Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 86, 7049-53.
- Ming, S. (1977). Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* 39, 2475-85.
- Miyachi, K., Fujita, M., Tanaka, N., Sasaki, K., y Sunagawa, M. (2002). Correlation between telomerase activity and telomeric-repeat binding factors in gastric cancer. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 21, 269-75.
- Mochizuki, S., y Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Science* 98, 621-628.
- Mohammad, D.H., y Yaffe, M.B. (2009). 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. *DNA Repair* 8, 1009-17.
- Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Fujie, T., Baba, K., Kusumoto, H., Haraguchi, M., Ueo, H., y Akiyoshi, T. (1997). Analysis of MT1-MMP and MMP2 expression in human gastric cancers. *International Journal Of Cancer* 74, 316-21.
- Morán, A., Iniesta, P., García-Aranda, C., de Juan, C., Díaz-López, A., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Díaz-Rubio, E., Balibrea, J.L., y Benito, M. (2005a). Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncology Reports* 13, 115-20.

- Morán, A., Iñiesta, P., de Juan, C., García-Aranda, C., Díaz-López, A., y Benito, M. (2005b). Impairment of Stromelysin-1 transcriptional activity by promoter mutations in high microsatellite instability colorectal tumors. *Cancer Research* 65, 3811-3814.
- Morán, A., Iñiesta, P., de Juan, C., González-Quevedo, R., Sánchez-Pernaute, A., Díaz-Rubio, E., Cajal, S.R., Torres, A., Balibrea, J.L., y Benito, M. (2002). Stromelysin-1 promoter mutations impair gelatinase B activation in high microsatellite instability sporadic colorectal tumors. *Cancer Research* 62, 3855-60.
- Mu, Y., Zhang, Q., Mei, L., Liu, X., Yang, W., y Yu, J. (2012). Telomere shortening occurs early during gastroduodenal carcinogenesis. *Medical Oncology* 29, 893-898.
- Mulligan, R. (1972). Histogenesis and biologic behavior of gastric carcinoma. *Pathology Annual* 7, 349-415.
- Muraki, K., Nyhan, K., Han, L., y Murnane, J.P. (2012). Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Frontiers In Oncology* 2.
- Murnane, J.P. (2010). Telomere Loss as a Mechanism for Chromosome Instability in Human Cancer. *Cancer Research* 70, 4255-4259.
- Murnane, J.P., Sabatier, L., Marder, B.A., y Morgan, W.F. (1994). Telomere dynamics in an immortal human cell line. *The EMBO Journal* 13, 4953-62.
- Murray, J.M., y Carr, A.M. (2008). Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication?. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 177-82.
- Muñoz, N., Correa, P., Cuello, C., y Duque, E. (1968). Histologic types of gastric carcinoma in high- and low-risk areas. *International Journal Of Cancer* 3, 809-818.
- Muñoz, P., Blanco, R., y Blasco, M.A. (2006). Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and ageing. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 5, 718-21.
- Müller, H. (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* 13, 181-198.
- Nagahara, H., Mimori, K., Utsunomiya, T., Barnard, G.F., Ohira, M., Hirakawa, K., y Mori, M. (2005). Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 11, 6800-6.
- Nagase, H., Visse, R., y Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69, 562-73.
- Nakamura, K., Sugano, H., y Takagi, K. (1968). Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. *Gann = Gan* 59, 251-8.
- Nakamura, M., Miyamoto, S., Maeda, H., Ishii, G., Hasebe, T., Chiba, T., Asaka, M., y Ochiai, A. (2005). Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 333, 1011-6.

Nergadze, S.G., Farnung, B.O., Wischnewski, H., Khorauli, L., Vitelli, V., Chawla, R., Giulotto, E., y Azzalin, C.M. (2009). CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA* 15, 2186-2194.

Ng, L.J., Cropley, J.E., Pickett, H.A., Reddel, R.R., y Suter, C.M. (2009). Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. *Nucleic Acids Research* 37, 1-8.

Nicholson, D.W., y Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends In Biochemical Sciences* 22, 299-306.

Njajou, O.T., Blackburn, E.H., Pawlikowska, L., Mangino, M., Damcott, C.M., Kwok, P., Spector, T.D., Newman, A.B., Harris, T.B., Cummings, S.R., et al. (2010). A common variant in the telomerase RNA component is associated with short telomere length. *Plos One* 5, e13048.

Nomura, T., y Katunuma, N. (2005). Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *The Journal Of Medical Investigation : JMI* 52, 1-9.

Núñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., y Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17, 3237-45.



'Reilly, M.S., Wiederschain, D.,

Stetler-Stevenson, W.G., Folkman, J., y Moses, M.A. (1999). Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *The Journal Of Biological Chemistry* 274, 29568-71.

Oda, T., Kanai, Y., Oyama, T., Yoshiura, K., Shimoyama, Y., Birchmeier, W., Sugimura, T., y Hirohashi, S. (1994). E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 91, 1858-62.

Odagiri, E., Kanada, N., Jibiki, K., Demura, R., Aikawa, E., y Demura, H. (1994). Reduction of telomeric length and c-erbB-2 gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. Relationship to histologic grade and clinical parameters. *Cancer* 73, 2978-84.

Ogden, S.R., Wroblewski, L.E., Weydig, C., Romero-Gallo, J., O'Brien, D.P., Israel, D.A., Krishna, U.S., Fingleton, B., Reynolds, A.B., Wessler, S., et al. (2008). p120 and Kaiso regulate *Helicobacter pylori*-induced expression of matrix metalloproteinase-7. *Molecular Biology Of The Cell* 19, 4110-4121.

Okamoto, K., Iwano, T., Tachibana, M., y Shinkai, Y. (2008). Distinct roles of TRF1 in the regulation of telomere structure and lengthening. *The Journal Of Biological Chemistry* 283, 23981-8.

- Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal Of Theoretical Biology* 41, 181-90.
- Opresko, P.L., Kobbe, von, C., Laine, J., Harrigan, J., Hickson, I.D., y Bohr, V.A. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *The Journal Of Biological Chemistry* 277, 41110-9.
- Ortega, P., Moran, A., Fernandez-Marcelo, T., de Juan, C., Frias, C., Lopez-Asenjo, J., Sanchez-Pernaute, A., Torres, A., Diaz-Rubio, E., Iniesta, P., et al. (2010). MMP-7 and SGCE as distinctive molecular factors in sporadic colorectal cancers from the mutator phenotype pathway. *International Journal Of Oncology* 36, 1209-15.
- Ottini, L. (2004). MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability. *Carcinogenesis* 25, 2337-2343.
- Ottini, L., Falchetti, M., Lupi, R., Rizzolo, P., Agnese, V., Colucci, G., Bazan, V., y Russo, A. (2006). Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Annals Of Oncology : Official Journal Of The European Society For Medical Oncology / ESMO* 17 Suppl 7, vii97-102.
- Oue, N., Mitani, Y., Motoshita, J., Matsumura, S., Yoshida, K., Kuniyasu, H., Nakayama, H., y Yasui, W. (2006). Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* 106, 1250-9.
- Oue, N., Oshimo, Y., Nakayama, H., Ito, R., Yoshida, K., Matsusaki, K., y Yasui, W. (2003). DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: association with histological type and CpG island methylator phenotype. *Cancer Science* 94, 901-5.
- Overall, C.M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Molecular Biotechnology* 22, 51-86.
- Owens, D.M., y Watt, F.M. (2003). Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nature Reviews. Cancer* 3, 444-51.
- Palm, W., y Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual Review Of Genetics* 42, 301-34.
- Park, H.J., Kim, H., Kim, J.W., Park, S.Y., Kim, B.R., Ryu, H.Y., Lee, Y., Lee, Y.K., y Cho, M.Y. (2013). Is microsatellite instability (MSI) associated with multiplicity in early stage gastric neoplasias?. *Clinics And Research In Hepatology And Gastroenterology* 37, 400-5.
- Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal Of Cancer* 118, 3030-3044.
- Parrish, A.B., Freel, C.D., y Kornbluth, S. (2013). Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* 5, a008672-a008672.

Parsonnet, J., Vandersteen, D., Goates, J., Sibley, R.K., Pritikin, J., y Chang, Y. (1991). *Helicobacter pylori* infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *Journal Of The National Cancer Institute* 83, 640-3.

Patel, M.M., Parekh, L.J., Jha, F.P., Sainger, R.N., Patel, J.B., Patel, D.D., Shah, P.M., y Patel, P.S. (2002). Clinical usefulness of telomerase activation and telomere length in head and neck cancer. *Head & Neck* 24, 1060-7.

Pedram, M., Sprung, C.N., Gao, Q., Lo, A.W., Reynolds, G.E., y Murnane, J.P. (2006). Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Molecular And Cellular Biology* 26, 1865-78.

Peltomäki, P., Aaltonen, L.A., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J.P., Järvinen, H., Green, J.S., Jass, J.R., Weber, J.L., y Leach, F.S. (1993). Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)* 260, 810-2.

Perucho, M. (1996). Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nature Medicine* 2, 630-1.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.

Pfeiffer, V., y Lingner, J. (2012). TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *Plos Genetics* 8, e1002747.

Pinto, A.R., Li, H., Nicholls, C., y Liu, J. (2011). Telomere protein complexes and interactions with telomerase in telomere maintenance. *Frontiers In Bioscience (Landmark Edition)* 16, 187-207.

Poncet, D., Belleville, A., de Roodenbeke, C.T., de Climens, A.R., Ben Simon, E., Merle-Beral, H., Callet-Bauchu, E., Salles, G., Sabatier, L., Delic, J., et al. (2008). Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111, 2388-91.

Porro, A., Feuerhahn, S., Reichenbach, P., y Lingner, J. (2010). Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Molecular And Cellular Biology* 30, 4808-17.

Quesada, V., Ordóñez, G.R., Sánchez, L.M., Puente, X.S., y López-Otin, C. (2009). The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Research* 37, D239-D243.

Rampazzo, E., Bertorelle, R., Serra, L., Terrin, L., Candiotti, C., Pucciarelli, S., del Bianco, P., Nitti, D., van de Rossi, A.D., van de Rossi, A., et al. (2010). Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *British Journal Of Cancer* 102, 1300-1305.

- Randall, A., y Griffith, J.D. (2009). Structure of long telomeric RNA transcripts: the G-rich RNA forms a compact repeating structure containing G-quartets. *The Journal Of Biological Chemistry* 284, 13980-6.
- Redon, S., Reichenbach, P., y Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Research* 38, 5797-806.
- Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S.M., Mihalek, I., Williams, C.L., y Bertuch, A.A. (2013). TRF2 interaction with Ku heterotetramerization interface gives insight into c-NHEJ prevention at human telomeres. *Cell Reports* 5, 194-206.
- Ritchie, K.B., y Petes, T.D. (2000). The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* 155, 475-9.
- Rizki, A., y Lundblad, V. (2001). Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation. *Nature* 411, 713-6.
- Saharia, A., Teasley, D.C., Duxin, J.P., Dao, B., Chiappinelli, K.B., y Stewart, S.A. (2010). FEN1 ensures telomere stability by facilitating replication fork re-initiation. *The Journal Of Biological Chemistry* 285, 27057-66.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1988). *Molecular Cloning; a laboratory manual*.
- Sampl, S., Pramhas, S., Stern, C., Preusser, M., Marosi, C., y Holzmann, K. (2012). Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Translational Oncology* 5, 56-65.
- Sandell, L.L., Gottschling, D.E., y Zakian, V.A. (1994). Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 91, 12061-5.
- Sarthy, J.F., y Baumann, P. (2010). Apollo taking the lead in telomere protection. *Molecular Cell* 39, 489-91.
- Schneider, B.G., Bravo, J.C., Roa, J.C., Roa, I., Kim, M.C., Lee, K.M., Plaisance, K.T., McBride, C.M., y Mera, R. (2000). Microsatellite instability, prognosis and metastasis in gastric cancers from a low-risk population. *International Journal Of Cancer* 89, 444-452.
- Schoeftner, S., y Blasco, M.A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology* 10, 228-36.
- Schoeftner, S., y Blasco, M.A. (2009). A "higher order" of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *The EMBO Journal* 28, 2323-2336.
- Schwartz, S., Yamamoto, H., Navarro, M., Maestro, M., Reventós, J., y Perucho, M. (1999). Frameshift mutations at mononucleotide repeat in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Research* 59, 2995-3002.

- Sepulveda, A.R. (2013). Helicobacter, inflammation, and gastric cancer. *Current Pathobiology Reports* 1, 9-18.
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., y Ekström, A.M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology* 123, 985-91.
- Sfeir, A. (2012). Telomeres at a glance. *Journal Of Cell Science* 125, 1-6.
- Sfeir, A., Kabir, S., van Overbeek, M., Celli, G.B., y Lange, T. (2010). Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science (New York, N.Y.)* 327, 1657-61.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., y Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90-103.
- Shay, J.W., y Wright, W.E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26, 867-74.
- Shay, J.W., y Wright, W.E. (2006). Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5, 577-84.
- Shay, J.W., y Wright, W.E. (2010). Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Letters* 584, 3819-3825.
- Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., y Chapman, H.A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10, 197-206.
- Shiota, S., Suzuki, R., y Yamaoka, Y. (2013). The significance of virulence factors in Helicobacter pylori. *Journal Of Digestive Diseases* 14, 341-9.
- Shokal, U., y Sharma, P. (2012). Implication of microsatellite instability in human gastric cancers. *The Indian Journal Of Medical Research* 135, 599-613.
- Simpson, A.J., Caballero, O.L., y Pena, S.D. (2001). Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer. *Trends In Molecular Medicine* 7, 76-80.
- Sjödahl, K., Lu, Y., Nilsen, T.I., Ye, W., Hveem, K., Vatten, L., y Lagergren, J. (2007). Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *International Journal Of Cancer* 120, 128-32.
- Smirnova, A., Gamba, R., Khoriauli, L., Vitelli, V., Nergadze, S.G., y Giulotto, E. (2013). TERRA Expression Levels Do Not Correlate with Telomere Length and Radiation Sensitivity in Human Cancer Cell Lines. *Frontiers In Oncology* 3, 115.
- Smith, S., y Lange, T. (1997). TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends In Genetics : TIG* 13, 21-6.
- Smogorzewska, A., Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G., y Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Molecular And Cellular Biology* 20, 1659-68.

- Soung, Y.H., Jeong, E.G., Ahn, C.H., Kim, S.S., Song, S.Y., Yoo, N.J., y Lee, S.H. (2008). Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers. *Human Pathology* 39, 895-900.
- Soussi, T., y Bérout, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews. Cancer* 1, 233-40.
- Steensel, B., y Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-3.
- Steinert, S., Shay, J.W., y Wright, W.E. (2004). Modification of subtelomeric DNA. *Molecular And Cellular Biology* 24, 4571-80.
- Stewart, S.A., Stewart, S.A., Weinberg, R.A., y Weinberg, R.A. (2000). Telomerase and human tumorigenesis. *Seminars In Cancer Biology* 10, 399-406.
- Stock, M., y Otto, F. (2005). Gene deregulation in gastric cancer. *Gene* 360, 1-19.
- Suraweera, N., Duval, A., Reperant, M., Vaury, C., Furlan, D., Leroy, K., Seruca, R., Iacopetta, B., y Hamelin, R. (2002). Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123, 1804-11.
- Suzuki, M., Raab, G., Moses, M.A., Fernandez, C.A., y Klagsbrun, M. (1997). Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *The Journal Of Biological Chemistry* 272, 11730-7.
- Svinareva, L.V., Glukhov, A.I., Zimnik, O.V., Bykov, I.I., Khorobrykh, T.V., y Shvets, V.I. (2010). Detection of telomerase activity in gastric cancer. *Biomeditsinskaya Khimiya* 56, 602-8.
- Tahara, E. (2004). Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Scientific Publications* 327-49.
- Tajima, Y., Yamazaki, K., Makino, R., Nishino, N., Masuda, Y., Aoki, S., Kato, M., Morohara, K., y Kusano, M. (2007). Differences in the histological findings, phenotypic marker expressions and genetic alterations between adenocarcinoma of the gastric cardia and distal stomach. *British Journal Of Cancer* 96, 631-638.
- Takada, H., Imoto, I., Tsuda, H., Nakanishi, Y., Ichikura, T., Mochizuki, H., Mitsufuji, S., Hosoda, F., Hirohashi, S., Ohki, M., et al. (2005). ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene* 24, 8051-60.
- Takagi, S., Kinouchi, Y., Hiwatashi, N., Nagashima, F., Chida, M., Takahashi, S., Negoro, K., Shimosegawa, T., y Toyota, T. (2000). Relationship between microsatellite instability and telomere shortening in colorectal cancer. *Diseases Of The Colon And Rectum* 43, S12-7.

Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Hirano, H., Takeda, J., Yutsudo, M., y Inoue, M. (1999). Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Research* 59, 551-7.

Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Tanaka, M., y Inoue, M. (1998). Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Research* 58, 1558-61.

Tamura, G. (2006). Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World Journal Of Gastroenterology* : WJG 12, 192-8.

Tan, G., Peng, Z., Lu, J., y Tang, F. (2013). Cathepsins mediate tumor metastasis. *World Journal Of Biological Chemistry* 4, 91-101.

Thibodeau, S.N., Bren, G., y Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, N.Y.)* 260, 816-9.

Tommerup, H., Dousmanis, A., y Lange, T. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. *Molecular And Cellular Biology* 14, 5777-85.

Toyota, M., Ahuja, N., Suzuki, H., Itoh, F., Ohe-Toyota, M., Imai, K., Baylin, S., y Issa, J. (1999). Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Research* 59, 5438-42.

Tramacere, I., Negri, E., Pelucchi, C., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Corrao, G., Vecchia, C.L., y Boffetta, P. (2012). A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Annals Of Oncology : Official Journal Of The European Society For Medical Oncology / ESMO* 23, 28-36.

Turk, V., Turk, B., y Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal* 20, 4629-33.

Tycowski, K., Shu, M., Kukoyi, A., y Steitz, J. (2009). A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Molecular Cell* 34, 47-57.

Varjosalo, M., y Taipale, J. (2008).

Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & Development* 22, 2454-72.

Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., y Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current Pharmaceutical Design* 13, 387-403.

Vauhkonen, M., Vauhkonen, H., y Sipponen, P. (2006). Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 20, 651-674.

- Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., y Artandi, S.E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science (New York, N.Y.)* 323, 644-8.
- Venteicher, A.S., Meng, Z., Mason, P.J., Veenstra, T.D., y Artandi, S.E. (2008). Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 132, 945-57.
- Verdecchia, A., Corazzari, I., Gatta, G., Lisi, D., Faivre, J., y Forman, D. (2004). Explaining gastric cancer survival differences among European countries. *International Journal Of Cancer* 109, 737-41.
- Visse, R., y Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92, 827-39.
- WHO (1999). Pathology and genetics of tumours of the digestive system (Lyon: IARC Press).
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciú, P., Cech, T.R., y Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 506-10.
- Washington, K. (2010). 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Stomach. *Annals Of Surgical Oncology* 17, 3077-3079.
- Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New Biology* 239, 197-201.
- Weischer, M., Nordestgaard, B.G., Cawthon, R.M., Freiberg, J.J., Tybjaerg-Hansen, A., y Bojesen, S.E. (2013). Short telomere length, cancer survival, and cancer risk in 47102 Individuals. *JNCI Journal Of The National Cancer Institute* 105, 459-468.
- Wentzensen, I.M., Mirabello, L., Pfeiffer, R.M., y Savage, S.A. (2011). The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 20, 1238-1250.
- Werner, M., Becker, K.F., Keller, G., y Höfler, H. (2001). Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology* 127, 207-16.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., y Searson, P.C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews. Cancer* 11, 512-22.
- Wright, W.E., Tesmer, von, M., Huffman, K.E., Levene, S.D., y Shay, J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & Development* 11, 2801-2809.

Xiao, C., Ogle, S.A., Schumacher, M.A.,

Orr-Asman, M.A., Miller, M.L., Lertkowitz, N., Varro, A., Hollande, F., y Zavros, Y. (2010). Loss of parietal cell expression of Sonic hedgehog induces hypergastrinemia and hyperproliferation of surface mucous cells. *Gastroenterology* 138, 550-61, 561.e1-8.

Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S., y Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* 445, 559-62.

Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute,

P., Ahmad, R., y Kaur, G. (2014). Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention : APJCP* 15, 1085-91.

Yaghoobi, M., Bijarchi, R., y Narod, S.A. (2010). Family history and the risk of gastric cancer. *British Journal Of Cancer* 102, 237-42.

Yamada, M., Tsuji, N., Nakamura, M., Moriai, R., Kobayashi, D., Yagihashi, A., y Watanabe, N. (2002). Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers. *Anticancer Research* 22, 3303-7.

Yamamoto, H., Adachi, Y., Itoh, F., Iku, S., Matsuno, K., Kusano, M., Arimura, Y., Endo, T., Hinoda, Y., Hosokawa, M., et al. (1999a). Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 59, 3313-6.

Yamamoto, H., Itoh, F., Adachi, Y., Sakamoto, H., Adachi, M., Hinoda, Y., y Imai, K. (1997a). Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 112, 1290-6.

Yamamoto, H., Perez-Piteira, J., Yoshida, T., Terada, M., Itoh, F., Imai, K., y Perucho, M. (1999b). Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology* 116, 1348-57.

Yamamoto, H., Sawai, H., y Perucho, M. (1997b). Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Research* 57, 4420-6.

Yang, D., He, Q., Kim, H., Ma, W., y Songyang, Z. (2011). TIN2 protein dyskeratosis congenita missense mutants are defective in association with telomerase. *The Journal Of Biological Chemistry* 286, 23022-30.

Yang, S.M., Fang, D.C., Luo, Y.H., Lu, R., Battle, P.D., y Liu, W.W. (2001). Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions. *Journal Of Gastroenterology And Hepatology* 16, 876-82.

- Yashiro, M., Hirakawa, K., y Boland, C.R. (2010). Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC Cancer* 10, 303.
- Yoo, N.J., Lee, J.W., Kim, Y.J., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W., Park, W.S., Lee, J.Y., y Lee, S.H. (2004). Loss of caspase-2, -6 and -7 expression in gastric cancers. *AP-MIS : Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica* 112, 330-5.
- Yousef, G.M., White, N.M., Michael, I.P., Cho, J.C., Robb, J.D., Kurlender, L., Khan, S., y Diamandis, E.P. (2005). Identification of new splice variants and differential expression of the human kallikrein 10 gene, a candidate cancer biomarker. *Tumour Biology : The Journal Of The International Society For Oncodevelopmental Biology And Medicine* 26, 227-35.
- Yu, Q., y Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development* 14, 163-76.
- Zheng, L., Wang, L., Ajani, J., y Xie, K. (2004). Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer : Official Journal Of The International Gastric Cancer Association And The Japanese Gastric Cancer Association* 7, 61-77.
- Zhou, X.Z., y Lu, K.P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107, 347-59.
- Zhu, X., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J.H., y Lange, T. (2003). ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Molecular Cell* 12, 1489-98.
- Zvereva, M.I., Shcherbakova, D.M., y Dontsova, O.A. (2010). Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry* 75, 1563-83.
- Zhang, F., Zhang, X., y Fan, D. (1998). Expression of telomere and telomerase in human primary gastric carcinoma. *Chinese Journal Of Pathology* 27, 429-32.
- Zhang, Q., Kim, N., y Feigon, J. (2011). Architecture of human telomerase RNA. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 108, 20325-32.

Summary

7

7.1

SUMMARY

STUDY OF TELOMERE FUNCTION AND INVASION-RELATED MOLECULES IN GASTRIC TUMORS WITH AND WITHOUT MICROSATELLITE INSTABILITY

Introduction

Gastric cancer (GC) remains as one of the most common cancers in developed countries although its incidence and mortality rates have steadily declined in the last fifty years (1). The development of gastric adenocarcinoma is a complex multistep process involving numerous genetic alterations. Gastric cancer development proceeds through three different molecular pathways: the chromosomal instability (CIN) pathway, the mutator phenotype (or microsatellite instability pathway, MSI) pathway and the CpG island methylator phenotype (CIMP) pathway (2). The mutator phenotype pathway is characterized by frequent mutations in regions of the DNA containing microsatellite sequences. Microsatellite stable tumours or tumours with low levels of microsatellite instability (MSS/MSI-L) develop through the CIN pathway, whereas the tumours with high microsatellite instability (MSI-H) are considered to develop through the mutator phenotype carcinogenic pathway. For the latter, the genes of the mismatch repair (MMR) system are damaged, thus the repair of DNA base mismatches is compromised. Primary alterations in MMR genes cause a considerable accumulation of mutations in microsatellite sequences (3). However, the role of the mutator phenotype carcinogenic pathway in gastric carcinogenesis, tumour progression and patient survival remains to be determined.

On the other hand, the role of telomeres and telomerase in the initiation and progression of some human cancers has been extensively evaluated. It has been suggested that telomere dysfunction is an important mechanism of genetic instability (4). Many oncogenes, tumour suppressor genes and apoptosis-related genes are involved in the multistage carcinogenesis of GC. However, the involvement and prognostic importance of telomere structure and function has not yet been established in this type of carcinoma.

Aims

The aims of the work developed during the course of this thesis are listed below:

1. Determination of the clinicopathological features of gastric tumours with microsatellite instability and the potential impact on the clinical prognosis of microsatellite instability.
2. Analysis of telomere length role, telomerase activity and expression of telomere related factors in the development of gastric cancers and their implication in the clinical prognosis.
3. Evaluation of the involvement of telomere function in gastric cancers with and without microsatellite instability.
4. Investigation of proteases involved in gastric tumours progression.

Materials and methods

This study was carried out in 85 primary sporadic gastric adenocarcinoma samples obtained from patients who had undergone surgery at San Carlos Hospital in Madrid, Spain. Non-tumour tissues from the same patients were used as controls. Gastric adenocarcinomas were classified by anatomic site as proximal or distal, and by histological phenotype as intestinal, diffuse, or mixed/unclassifiable according to Lauren's classification. The stage of tumour was established according to the TNM classification. Five years follow-up data and the clinicopathological characteristics of each patient were obtained from Hospital records. The MSI status was determined with MSI Analysis System Version 1.2 (Promega, USA), which included *BAT-25*, *BAT-26*, *NR-21*, *NR-24* and *MONO-27* as markers. According to the microsatellite instability status, samples with instability in two or more of these markers are defined as MSI-High (MSI-H), whereas those with one unstable marker are designated as MSI-Low (MSI-L). Samples with no detectable alterations are MSI-Stable (MSS).

We evaluated telomere function in tumours and control tissues by analyzing telomerase activity and telomere length. The former was established using the TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) assay; and the latter using the terminal restriction fragment (TRF) length method. The TRF

length ratio (T/N ratio) was defined as the relation between telomere lengths in tumour and their corresponding non-tumour sample for each patient. Telomere repeat binding factors 1 and 2 (*TRF1* and *TRF2*) expression levels were evaluated by Real Time Quantitative PCR (qRT-PCR) using TaqMan[®] probes (FAM TM dye-labeled TaqMan[®] MGB probes, Applied Biosystems, USA), following manufacturer's instructions. For quantification of genes expression, the target genes values were normalized to the expression of the endogenous reference (*GAPDH*). The comparative threshold cycle (Ct) method was used to calculate the relative expression. This quantification is given by a relative quantification value (RQ), being $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tumour sample}} - \Delta Ct_{\text{non-tumour sample}}$); ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{endogenous gene}}$). Transcript levels of total telomeric RNA (TERRA) were measured by Real Time Quantitative PCR with SYBR Green[®] and relative quantities (RQ) were determined in relation to the levels of *36B4* and to the levels found in control tissue samples according to Pfaffl's method. Gene expression of 31 proteases implicated in progression and metastasis of GC was determined by Real Time Quantitative PCR using TaqMan[®] Array Micro Fluidic Cards (Life Technologies, USA), following manufacturer's instructions.

Group-oriented curves for disease-free survival (DFS) were calculated according to the Kaplan-Meier method considering microsatellite instability, telomere length, T/N ratio and telomerase activity. Only patients who had undergone potentially curative surgery were considered. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazard model to identify significant predictors of survival. Cutoff Finder web application was used to determine optimal cutoff values (4). IBM SPSS Statistics version 19 (International Business Machines, USA) was used for all statistical analyses.

Results

The results obtained in this thesis showed that 18.1% of tested gastric cancers displayed high microsatellite instability and 81.9% were MSI-L/MSS. After the Kaplan-Meier analysis, the patients with MSI-H gastric tumors displayed significantly better prognosis than patients with MSI-L/MSS gastric cancers ($p = 0.030$). In addition, microsatellite instability proved to be an independent prognostic marker in multivariate analysis (MSI-L/MSS vs. MSI-H, $RR = 4.862$, $p = 0.033$).

We analyzed telomerase activity and telomere length in tumour samples and controls. A positive telomerase activity was determined in 77.6% of tumour samples, the remaining 22.4% displayed negative telomerase activity. Telomere length in tumour tissue samples was significantly

shorter than in non-tumoral adjacent tissues: 5.25 ± 0.28 kbp and 5.96 ± 0.23 kbp, respectively ($p = 0.001$). The mean T/N ratio was 0.92 ± 0.04 kbp (mean \pm standard error). The optimal cutoff point for the mean tumor telomere length was 2.86 kbp. The patients with a mean tumor telomere length ≤ 2.86 kbp experienced a significantly worse clinical evolution compared to the patients whose mean tumour telomere length was > 2.86 kbp ($p = 0.015$). Telomere length also proved to be an independent prognostic marker in multivariate analysis (TRF T ≤ 2.86 kbp vs. TRF T > 2.86 kbp, RR = 4.017, $p = 0.003$). Telomerase activity showed no significant association with patients prognosis ($p = 0.476$). We considered two groups according to MSI status for establishing differences in relation to telomere function. Overall, MSI-H tumours had shorter telomeres than MSI-L/MSS tumours, without significant differences (4.66 ± 0.54 kbp vs. 5.37 ± 0.32 kbp; $p = 0.414$). Moreover, 100% of tumours with MSI-H displayed positive telomerase activity, whereas this feature was detected in 72.1% of MSI-L/MSS gastric cancers ($p = 0.020$). Additionally, we performed a prognostic analysis considering tumour telomere length depending on microsatellite instability status which showed that tumour telomere length shorter than 2.86 kbp was a worse prognostic factor in both types of gastric cancer ($p = 0.047$).

On the other hand, we developed an analysis of *TRF1* and *TRF2* expression, and quantitative levels of TERRA in a subgroup of 50 samples of GC and their corresponding control tissues. *TRF1* and *TRF2* expression was diminished in tumours as compared to control tissue samples (RQ values: 0.72 ± 0.11 for *TRF1* and 0.55 ± 0.05 for *TRF2*), statistically significant differences were found for both genetic expression levels compared to the control tissues samples ($p < 0.001$ for both). In addition, results indicated a significant increase in TERRA levels in tumour samples compared to non-tumour samples ($p = 0.043$).

Additionally, we compared the expression levels of *TRF1* and *TRF2* between MSI groups. RQ values for *TRF1* and *TRF2* were 0.39 ± 0.11 and 0.34 ± 0.04 in MSI-H tumours and 0.82 ± 0.13 and 0.62 ± 0.06 in tumours classified as MSI-L/MSS. Our data showed a significantly lower expression of *TRF1* and *TRF2* genes in MSI-H tumours than MSI-L/MSS cancers ($p = 0.008$ and $p = 0.006$, respectively). TERRA levels determined in MSI-H tumours were 1.04 ± 0.24 , and 4.93 ± 1.87 in MSI-L/MSS tumours. The difference between both groups was statistically significant ($p = 0.046$). Therefore, our results showed a significant decrease in the levels of TERRA in gastric tumours with MSI-H compared to tumours with MSI-L/MSS. Finally, the study of proteases involved in invasion and metastasis of gastric cancer, demonstrated an overexpression of *ADAM12*, *ADAMTS18*, *MMP1*, *MMP3*, *MMP7*,

MMP9, *MMP13*, *CASP5*, *CTSB*, *KLK6*, *KLK10*, *UCHL*, *SERPINE-1*, and *TIMP1* in tumour tissues in relation to control tissues. In addition, we detected significant differential expression values between MSI-H and MSI-L/MSS gastric tumours for *ADAM15*, *ADAM23*, *DHH*, *SHH*, *HTRA-2* and *TIMP2* ($p = 0.003$, $p = 0.003$, $p = 0.023$, $p < 0.001$, $p = 0.034$, $p = 0.002$, respectively). Transcriptional expression for all these genes was higher in MSI-L/MSS gastric tumours compared to MSI-H tumours.

Conclusions

Microsatellite instability and telomere function could be considered as molecular markers with clinical useful for determining the prognosis of gastric cancer patients. In particular, the patients with MSI-H tumours showed a better clinical prognosis. A poor clinical evolution was found in the patients with critical telomere lengths in the tumour. However, a high rate of telomere shortening in gastric tumours is related with clinicopathological features of good prognosis. Moreover, we showed that MSI-H gastric tumours are associated with lower expression of *TRF1* and *TRF2*, and lower levels of telomeric RNA (TERRA). MSI-H gastric tumors are also associated with a lower expression of *ADAM15*, *ADAM23*, *DHH*, *SHH*, *HTRA-2* and *TIMP2* genes involved in the progression of gastric cancer.

References

- (1) Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal Of Cancer*
- (2) Hartgrink, H.H., Jansen, E.P., Grieken, N.C., Velde, C.J., van der Grieken, N.C., and van de Velde, C.J. (2009). Gastric cancer. *The Lancet* 374, 477-490.
- (3) Shokal, U., and Sharma, P. (2012). Implication of microsatellite instability in human gastric cancers. *The Indian Journal Of Medical Research* 135, 599-613.
- (4) Deng, Y., and Chang, S. (2007). Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Laboratory Investigation* 87, 1071-1076.
- (5) Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B., Györfy, B., Schmitt, W., Darb-Esfahani, S., and Denkert, C. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *Plos One* 7, e51862.

Anexos 8

Prognostic value of telomere function in gastric cancers with and without microsatellite instability

Irene Pascua^a, Tamara Fernández-Marcelo^a, Andrés Sánchez-Pernaute^b, Carmen de Juan^a, Jacqueline Head^a, Antonio-José Torres-García^b and Pilar Iniesta^a

Objective To identify molecular markers that may be useful in the selection of gastric cancer patients with different prognoses, we investigated telomere function in gastric cancers with and without microsatellite instability (MSI).

Materials and methods We analyzed 83 gastric cancers and its paired-normal tissues to investigate MSI and telomere function. MSI was established using five polymorphic human repeat DNA markers. Telomere function was evaluated by determining telomerase activity, telomere length, and telomere-repeat factors 1 and 2 (*TRF1* and *TRF2*) expression.

Results Patients with high microsatellite instability (MSI-H) gastric cancers showed a significantly better prognosis than those affected by microsatellite stable or low microsatellite instability (MSS/MSI-L) tumors ($P=0.03$). The lowest expression levels of *TRF1* and *TRF2* were associated with MSI-H gastric cancers ($P=0.008$ and 0.006 , respectively). Moreover, a clear trend toward a worse prognosis was found in the group of patients who had tumors with the shortest telomeres ($P=0.01$). Cox multivariate analysis showed that MSI emerged as a protective prognostic factor; MSS/MSI-L tumors conferred a significantly poor prognosis in patients

(relative risk = 4.862-fold greater than the MSI-H group) ($P=0.033$). Telomere length of gastric tumors less than 2.86 kbp was a factor that led to a poor prognosis (relative risk = 4.420, with respect to tumors showing telomere length ≥ 2.86 kbp) ($P=0.002$).

Conclusion We propose telomere status as a potential molecular marker with usefulness in the establishment of the prognosis of gastric cancers both for the mutator phenotype and for the suppressor pathway. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 27:162–169 © 2015 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2015, 27:162–169

Keywords: gastric cancer, microsatellite instability, telomere, telomere-binding proteins

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology II, Faculty of Pharmacy, Complutense University and ^bSurgery Service, San Carlos Hospital, Institute for Health Research from San Carlos Hospital (IdISSC), Madrid, Spain

Correspondence to Pilar Iniesta, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Pza. Ramón y Cajal s/n (Ciudad Universitaria), 28040 Madrid, Spain
Tel: +34 91 3942089; fax: +34 91 3941779; e-mail: insepi@ucm.es

Received 4 September 2014 Accepted 31 October 2014

Introduction

Gastric cancer (GC) remains one of the most common cancers and although its incidence and mortality rates have been decreasing steadily, the absolute number of new cases is actually increasing because of the aging population [1]. Approximately 95% of GC are adenocarcinomas, which have been classified by anatomic site as proximal cancers or distal cancers in epidemiological studies [2] and by histological phenotype as intestinal type, diffuse type, and mixed/unclassifiable according to Lauren's classification [3]. Patients with proximal GC have a poorer survival independent of the Tumor, Node, Metastasis staging system (TNM stage) [4].

The development of gastric adenocarcinoma is a complex multistep process involving multiple genetic alterations. Most GC show genetic instability, either microsatellite instability (MSI) or chromosomal instability (CIN). Molecular studies of alterations of single genes have provided evidence that intestinal-type and diffuse-type

GC evolve by different genetic pathways. Moreover, alterations in multiple single genes and complex copy number and gene expression profiles have been identified in GC over the last two decades. However, their significance in gastric carcinogenesis, tumor progression, and patient survival remains to be determined [1].

Two major carcinogenic pathways were initially described in colorectal cancer (CRC): the suppressor phenotype pathway, which constitutes 80% of sporadic CRCs; this group of tumors shows the CIN phenotype. The mutator phenotype pathway represents most cases of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and nearly 13% of all cases of sporadic CRC. In this case, genes of the mismatch repair (MMR) system undergo alterations that affect their role in the repair of DNA base mismatches. Primary alterations in *MMR* genes lead to a huge accumulation of mutations in microsatellite sequences and short-tandem repeat sequences widespread throughout the genome. Therefore, MSI is a form of genetic instability characterized by new alleles not

CURRÍCULUM VITAE

Irene Pascua García

30/08/1984

ipascuag@ucm.es

Telf. 619764900

TITULACIÓN ACADÉMICA

Licenciada en Farmacia, con especialidad en Investigación y desarrollo, especialidad Sanitaria y especialidad en Oficina de Farmacia, por la Universidad de Salamanca, en Enero de 2008.

Máster Oficial Universitario en Análisis Sanitarios (90 ECTS) por la Universidad Complutense de Madrid en Junio de 2010.

TRAYECTORIA EN INVESTIGACIÓN

Enero 2010 – actualidad: Becaria pre-doctoral en el Grupo del Cáncer de la Dra. M^a Pilar Iniesta Serrano; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (UCM).

Curso 2013-2014: Colaborador en docencia práctica del departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (UCM).

Curso 2012-2013: Colaborador honorífico del departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (UCM).

Curso 2011-2012: Colaborador en docencia práctica del departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (UCM).

Curso 2010-2011: Colaborador honorífico del departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (UCM).

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Título: Análisis de la función telomérica en relación con las vías de senescencia mediadas por p53 y por RB/p16 en cánceres humanos de alta incidencia.

Entidad financiadora: FIS y Fundación MMA.

Puesto desempeñado: Colaborador.

Inicio/ Finalización: 2009-2011.

Colaboradores: P. Iniesta (IP), M. Benito, A.J. Torres, C. de Juan, A. Sánchez-Pernaute, F. Hernando, A. Morán, C. Frías, P. Ortega, A. Gómez, T. Fernández, S. Hernández, J.A. López García-Asenjo, E. Pérez-Aguirre, Irene Pascua García.

Título: Telómeros y marcadores de senescencia y muerte celular en la Clínica del Cáncer No Microcítico de Pulmón.

Entidad financiadora: Proyectos de Investigación Santander-Universidad Complutense de Madrid 2013.

Puesto desempeñado: Colaborador.

Inicio/ Finalización: 2013-2014.

Colaboradores: P. Iniesta (IP), Carmen de Juan Chocano, Andrés Sánchez Pernaute, Florentino Hernando Tranco, Ana Gómez Martínez, Elia Pérez Aguirre, Tamara Fernández-Marcelo, Irene Pascua García, Jacqueline Head Abad.

Título: Análisis de mecanismos reguladores de la longitud telomérica y de factores relacionados con invasión, en relación con el pronóstico de cánceres gastrointestinales y no microcíticos de pulmón.

Entidad financiadora: Fundación MMA.

Puesto desempeñado: Colaborador.

Inicio/ Finalización: 2011-2014.

Colaboradores: P. Iniesta (IP), Antonio José Torres García, Manuel Benito de las Heras, Carmen de Juan Chocano, Alberto Morán Millán, Andrés Sánchez Pernaute, Florentino Hernando Tranco, Ana Gómez Martínez, Elia Pérez Aguirre, Luis Díez Valladares, Jose Ramón Jarabo Sarceda, Jose Antonio López García-Asenjo, Susana Hernández Prieto, Tamara Fernández-Marcelo, Irene Pascua García, Jacqueline Head Abad.

Título: Caracterización de las proteínas MDGA1 y MDGA2 implicadas en migración y adhesión celular. Análisis de su expresión en patologías tumorales humanas. Estudios a nivel genómico y proteómico. Resolución VII Convocatoria Ayudas Proyectos de Investigación.

Entidad financiadora: Fundación Mutua Madrileña.

Puesto desempeñado: Colaborador.

Inicio/ Finalización: 2010-2013.

Colaboradores: Carmen de Juan Chocano (IP), Pilar Iniesta, Andrés Sánchez Pernaute, Florentino Hernando Tranco, Ana Gómez Martínez, Elia Pérez Aguirre, Tamara Fernández-Marcelo, Irene Pascua García, Jacqueline Head Abad.

BECAS DISFRUTADAS

Organismo que concedió la beca: Fundación Mutua Madrileña Investigación Médica. Beca asociada a Proyecto. Realización de trabajos de investigación en el proyecto "Análisis de la función telomérica en relación con las vías de senescencia mediadas por p53 y por p16/Rb en cánceres humanos de alta incidencia".

Fecha de inicio y de fin: Noviembre 2010 – Julio 2011, Facultad de Farmacia. UCM.

Organismo que concedió la beca: Fundación Mutua Madrileña Investigación Médica. Beca asociada a Proyecto. Realización de trabajos de investigación en el proyecto "Análisis de mecanismos reguladores de la longitud telomérica y de factores relacionados con invasión, en relación con el pronóstico de cánceres gastro-intestinales y no microcíticos de pulmón".

Fecha de inicio y de fin: Enero 2012 – Marzo 2012, Enero 2013 – Junio 2013, Octubre 2013 – Noviembre 2013. Facultad de Farmacia. UCM.

PUBLICACIONES

Pascua, I., Fernandez-Marcelo, T., Sánchez-Pernaute, A., de Juan, C., Head, J., Torres, AJ., Iniesta, I. Prognostic value of telomere function in gastric cancers with and without microsatellite instability. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb;27(2):162-9.

González-Ruiz, V., **Pascua, I.**, Fernández-Marcelo, T., Ribelles, P., Bianchini, G., Sridharan, V., Iniesta, P., Ramos, MT., Olives, AI., Martín, MA., Menéndez, JC. (2014). B-ring-aryl substituted luotonin A analogues with a new binding mode to the topoisomerase 1-DNA complex show enhanced cytotoxic activity. *PLoS One* 9(5):e95998.

Fernández-Marcelo, T., Frías, C., **Pascua, I.**, de Juan, C., Head, J., Gómez, A., Hernando, F., Jarabo, JR., Díaz-Rubio, E., Torres, AJ., Rouleau, M., Benito, M., Iniesta, P. (2014). Poly (ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a potential repressor of telomerase activity. *J Exp Clin Cancer Res* 33:19.

Fernández-Marcelo, T., Morán, A., de Juan, C., **Pascua, I.**, Head, J., Gómez, A., Hernando, F., López-Asenjo, JA., Hernández, S., Sánchez-Pernaute, A., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P. (2012). Differential expression of senescence and cell death factors in non-small cell lung and colorectal tumors showing telomere attrition. *Oncology* 82(3), 153-64.

Morán, A., Fernández-Marcelo, T., Carro, J., de Juan, C., **Pascua, I.**, Head, J., Gómez, A., Hernando, F., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P. (2012). Methylation profiling in non-small cell lung cancer: clinical implications. *Int J Oncol* 40(3), 739-46.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

De Juan, C., Fernández-Marcelo, T., **Pascua, I.**, Head, J., Sánchez-Pernaute, A., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P.
Clinical relevance of telomere length and telomerase activity in colorectal cancer. 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. Munich, 2014. (Comunicación tipo póster).

Fernández-Marcelo T., **Pascua I.**, De Juan C., Head J., Gómez A., Hernando F., Jarabo JR., Torres AJ., Benito M., Iniesta P.
Telomere length and DAPK1 expression: prognosis implication in non-small cell lung cancer.
23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. Munich, 2014. (Comunicación tipo póster).

Bianchini, G., González-Ruiz, V., **Pascua, I.**, Fernández-Marcelo, T., Ribelles, P., Velaisamy, S., Iniesta, P., Ramos, MT., Olives, AI., Martín, MA., Menéndez, JC.
New luotonin A analogues bearing aryl substituents at the B-ring show a new binding mode to the topoisomerase I-DNA complex and enhanced cytotoxicities.
International Symposium on Medicinal Chemistry. Lisboa, 2014.
(Comunicación tipo póster).

Fernández-Marcelo, T., **Pascua, I.**, de Juan, C., Head, J., Gómez, A., Jarabo, JR., Fernández, E., Benito, M., Iniesta, P., Hernando, F.
Telomere length, telomerase activity and DAPK1 expression, new markers for prognosis in non-small cell lung cancer.
4th European Lung Cancer Conference. Ginebra, 2014.
(Comunicación tipo póster).

González-Ruiz, V., **Pascua, I.**, Fernández-Marcelo, T., Ribelles, P., Ramos, MT., Menéndez, JC., Iniesta, P., Olives, AI., Martín, MA.
Actividad inhibidora de topoisomerasa I de luotonina A y análogos. Correlación con su actividad antitumoral.
XXXIV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química. Santander, 2013.
(Comunicación tipo póster).

Pascua, I., Sánchez-Pernaute, A., Fernández-Marcelo, T., de Juan, C., Head, J., Pérez-Aguirre, E., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P.
Differential telomere function in gastric tumors with and without microsatellite instability.
XIV ASEICA International Congress. Madrid, 2013. (Comunicación tipo póster).

Fernández-Marcelo, T., **Pascua, I.**, de Juan, C., Head, J., Gómez, A., Hernando, F., Jarabo, JR., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P.
Prognostic significance of telomere length and telomere activity in non-small cell lung cancer.
XIV ASEICA International Congress. Madrid, 2013. (Comunicación tipo póster).

Head, J., Fernández-Marcelo, T., **Pascua, I.**, Iniesta, P., Benito, M., Parsons, M., de Juan, C.
Analysis of migration and invasion capacities of MDCK cells expressing MDGA1 or MDGA2 proteins.
XIV ASEICA International Congress. Madrid, 2013. (Comunicación tipo póster).

Fernández-Marcelo T., **Pascua I.**, De Juan C., Head J., Gómez A., Hernando F., Jarabo JR., Torres A., Benito M., Iniesta P.
La disminución de expresión de DAPK1 se asocia con disfunción telomérica, un factor de pronóstico adverso en el cáncer no microcítico de pulmón.

XXXVI Congreso SEBBM. Madrid, 2013. (Comunicación tipo póster).

Fernández-Marcelo, T., Morán, A., de Juan, C., **Pascua, I.**, Head, J., Gómez, A., Hernández, F., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P.

Relationship between histology and telomere status in non-small cell lung cancers. New approach for molecular-targeted therapies.

22nd Congress of the European Association for Cancer Research. Barcelona, 2012. (Comunicación tipo póster).

de Juan, C., Head, J., Espada, J., Morán, A., Fernández-Marcelo, T., **Pascua, I.**, Sánchez-Pernaute, A., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P.

MDGA1 expression and promoter methylation analysis in colorectal cancer.

European Multidisciplinary Cancer Congress. Estocolmo, 2011.

(Comunicación tipo póster).

Pascua, I., Sánchez-Pernaute, A., Fernández-Marcelo, T., de Juan, C., Morán, A., Head, J., Carro, J., Bartolomé, E., López-Asenjo, JA., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P.

Telomere function and genetic instability in gastric cancer: clinical implications.

XIII Congreso Nacional ASEICA, Salamanca, 2011. (Comunicación tipo póster).

Carro, J., Morán, A., Fernández-Marcelo, T., **Pascua, I.**, de Juan, C., Head, J., Hernández, F., Gómez, A., Hernández, S., López-Asenjo, JA., Torres, AJ., Benito, M., Iniesta, P.

Expression of proteases in non-small cell lung cancer. Correlation with clinical and pathologic parameters.

XIII Congreso Nacional ASEICA, Salamanca, 2011. (Comunicación tipo póster).

Head, J., Espada, J., Iniesta, P., Morán, A., Fernández-Marcelo, T., **Pascua, I.**, Carro, J., Sánchez-Pernaute, A., Torres, AJ., Benito, M., de Juan, C.

MDGA2 expression and promoter methylation analysis in colorectal cancer.

XIII Congreso Nacional ASEICA, Salamanca, 2011. (Comunicación tipo póster).

Fernández-Marcelo, T., Frías, C., **Pascua, I.**, de Juan, C., Morán, A., Head, J., Carro, J., Bartolomé, E., Benito, M., Iniesta,

P. Poly (ADP-Ribose) Polymerase 3 (PARP3) as a possible repressor of telomerase activity. XIII Congreso Nacional ASEICA, Salamanca, 2011. (Comunicación oral).

CURSOS Y SEMINARIOS

Curso: Documentación y análisis de geles y membranas fluorescentes, colorimétricas y quimioluminescentes con el ChemiDoc XRS+. Madrid, 2011. BioRad.

Tipo de participación: asistente.

Denominación del evento: International Symposium: "The next 20 years of telomere research". Madrid, 2011. Centro nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y la Fundación Ramón Areces.

Tipo de participación: asistente.

Curso: "Introducción a SPSS". Aula del Real Jardín Botánico Alfonso XIII de la UCM. Madrid. 2010. Servicios Informáticos de la UCM.

Tipo de participación: asistente.

Denominación del evento: XLII Lección conmemorativa Jiménez Díaz. Madrid, 2010. Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

Tipo de participación: asistente.

Curso: Real Time PCR y secuenciación masiva de DNA. Aplicaciones. Madrid, 2010. Roche Applied Science.

Tipo de participación: asistente.

OTROS MÉRITOS

Premios: Premio "COFARES" de la Real Academia Nacional de Farmacia por el trabajo "Nuevos inhibidores interfaciales de la enzima topoisomerasa 1 con actividad anti-tumoral mejorada", 2014.

Informática: manejo de Office (nivel de usuario). Diferentes programas informáticos (SPSS 19.0, Quantity One, Image gauge 3.46, Image J, etc.).

